



**UNIVERSITE DE LIEGE
FACULTE DE MEDECINE VETERINAIRE
DEPARTEMENT DES SCIENCES DES DENREES ALIMENTAIRES
SERVICE D'INSPECTION DES DENREES ALIMENTAIRES**

**INVESTIGATION SUR LA QUALITE DU LAIT CRU PRODUIT DANS
LE BASSIN LAITIER DE NIAMEY (NIGER)**

**RESEARCH ON THE QUALITY OF RAW MILK PRODUCED IN THE
DAIRY POOL OF NIAMEY (NIGER)**

Amadou MOROU MADOUGOU

**THESE PRESENTEE EN VUE DE L'OBTENTION DU GRADE DE
Docteur en Sciences Vétérinaires**

ANNEE ACADEMIQUE 2019-2020



UNIVERSITE DE LIEGE
FACULTE DE MEDECINE VETERINAIRE
DEPARTEMENT DES SCIENCES DES DENREES ALIMENTAIRES
SERVICE D'INSPECTION DES DENREES ALIMENTAIRES

**INVESTIGATION SUR LA QUALITE DU LAIT CRU PRODUIT DANS
LE BASSIN LAITIER DE NIAMEY (NIGER)**

**RESEARCH ON THE QUALITY OF RAW MILK PRODUCED IN THE
DAIRY POOL OF NIAMEY (NIGER)**

Amadou MOROU MADOUGOU

**THESE PRESENTEE EN VUE DE L'OBTENTION DU GRADE DE
Docteur en Sciences Vétérinaires**

ANNEE ACADEMIQUE 2019-2020

Jury composé de :

Président : Thomas MARICHAL (Uliege, Belgique)

Promoteur : Nicolas KORSACK (Uliege, Belgique)

Co- Promoteur: Hamani MARICHATOU (Université de Niamey, Niger)

Membres du comité : Georges DAUBE (Uliege, Belgique)

Véronique DELCENSERIE (Uliege, Belgique)

Membres extérieurs à l'ULiège : Nathalie GNANOU BESSE (Anses, France)

Laurent GUILLIER (Anses, France)

Membres internes à l'ULiège : Jean Luc HORNICK (Uliege, Belgique)

Marianne SINDIC (Uliege, Belgique)

Frédéric Rollin (Uliege, Belgique)

Damien THIRY (Uliege, Belgique)

Remerciements

Je mesure toute la difficulté d'établir une liste exhaustive de tous ceux qui ont bien voulu contribuer à l'aboutissement de cette thèse. Puissent celles ou ceux dont les noms n'ont pas été mentionnés sous ces lignes se rassurer de l'expression de toute ma profonde gratitude.

Mes vifs remerciements sont d'abord adressés à mon promoteur, Nicolas KORSAK, et mon co-promoteur, Hamani MARICHATOU, pour m'avoir accompagné pendant ces années d'intenses et passionnantes recherches.

Professeur Nicolas KORSAK, qui a dirigé ce travail avec un esprit innovateur. Votre rigueur, votre capacité d'analyse des problèmes et votre ouverture d'esprit m'ont permis de progresser dans mon travail de thèse. Merci pour m'avoir formé. Enfin, vos qualités scientifiques et humaines m'ont beaucoup marqué durant mes séjours belges.

Professeur Hamani MARICHATOU, votre contribution à la réalisation de cette thèse m'a permis de tirer profit de votre expérience sur la problématique de l'élevage au Niger à travers nos multiples discussions de la conception du projet jusqu'à la finalisation de la thèse. Merci aussi de m'avoir accordé toute la confiance dès les premières heures de ce travail de thèse.

J'adresse également toute ma reconnaissance aux Professeurs Georges DAUBE et Véronique DELCENSERIE, membres du comité de pilotage de la thèse, pour la disponibilité, pour avoir accepté de participer au comité d'accompagnement de cette thèse. Merci pour votre contribution à l'amélioration de cette thèse.

Mes remerciements vont à l'endroit du Professeur Thomas MARICHAL, pour avoir accepté de présider le Jury. Merci pour votre contribution à l'amélioration de cette thèse.

Aux membres du jury, Professeurs Nathalie GNANOU BESSE, Laurent GUILLIER, Jean Luc HORNICK, Frédéric ROLLIN, Marianne SINDIC et Damien THIRY, je vous remercie d'avoir accepté de juger notre travail malgré vos multiples occupations. Vos observations et suggestions pertinentes contribueront significativement à l'amélioration de notre travail. Recevez l'expression de mes sincères remerciements.

Je remercie le Docteur Nassim MOULA pour sa contribution inestimable dans la réalisation de mes travaux de recherche. Vos observations et conseils ont été très précieux durant toute la durée

cette thèse. Merci pour toutes les facilités que vous m'avez offertes pour l'accomplissement de ce travail à toutes ses étapes.

Je remercie le Docteur Bernard TAMINIAU. Vos contributions pertinentes ont beaucoup amélioré mes analyses métagénétiques. Auprès de vous, j'ai appris beaucoup de vos conseils et vos remarques dans la réalisation de ce travail de thèse.

Je remercie le Docteur Issa HAMADOU pour toutes les facilités que vous m'avez offertes pour l'accomplissement de ce travail de thèse. Vos observations pertinentes ont beaucoup contribué à l'amélioration de mes travaux.

Mes remerciements à toute l'équipe du Département des Denrées alimentaires (Professeurs Marie Louis SCIPPO et Antoine CLINQUART, Dr Caroline DOUNY Sébastien CREVECOEUR, Emilie CAUCHIE, Elisa MARTINEZ, Sarah LEBRUN, Pauline BONDUE, Barbara et Christine BAL). Au-delà de nos discussions purement professionnelles, vous avez partagé mon quotidien et souvent contribué à le rendre plus agréable.

Cette thèse a été réalisée grâce au soutien financier du Programme de Productivité Agricole en Afrique de l'Ouest (PPAAO-Niger) et j'exprime ma gratitude et mes remerciements à l'ensemble du personnel PPAAO et CRS/EL.

J'exprime ma gratitude et mes remerciements à l'ensemble des doctorants, stagiaires pour vos contributions et vos encouragements.

Mes remerciements vont ensuite au Ministère de l'Elevage en particulier à Mr DIAMOITOU Boukary, Secrétaire Général et Président du comité de pilotage des projets dudit Ministère ainsi que l'ensemble du personnel du laboratoire Central de l'Elevage (LABOCEL).

Mes remerciements aux Dr Hamma Hamma, Dr BAARE Cathérine, Dr Souley Moutari, Mr DJIBO Hamidou, Ali Hamdallaye, Moumouni Kollo et l'ensemble des éleveurs et personnel des centres de collecte du bassin laitier de Niamey pour votre aides et vos encouragements dans la réalisation de cette thèse.

Merci à ma femme et mes enfants, ma famille et mes ami(e)s: je tiens à exprimer ma profonde gratitude à mes parents ; mes frères et sœurs, mes oncles et tantes, mes cousins et cousines, mes neveux et nièces, merci pour vos soutiens divers et variés.

Liste des figures

Introduction

Figure 1 : Carte administrative du Niger avec les pays limitrophes.....	10
Figure 2 : Les principales races bovines du Niger.....	14
Figure 3 : Appareil Delvotest et résultats.....	23

Section expérimentale

Etude N°2

Figure 1 : Representation géographique de la zone d'étude.....	54
----------------------------------------------------------------	----

Etude N°3

Figure 1 : Représentation géographique de la zone d'étude.....	77
Figure 2: Bacterial alpha –diversity.....	81
Figure 3: Bacterial abundance of the 6 phylla common to the 36 raw milk.....	82
Figure 4: Bacterial genera found in the raw milk.....	82

Etude N°4

Figure 1: Area of Study.....	101
Figure 2: Breeds encountered in the area of study.....	102
Figure 3: Bacterial parameters.....	105
Figure 4: Bacterial genera in raw milk from Hamdallaye and Kollo.....	107
Figure 5: Principal coordinate analysis plots based upon the Bray-Curtis dissimilarity.....	108

Discussion

Figure 1: Effet des saisons sur la flore microbienne en fonction des moyennes.....	128
------------------------------------------------------------------------------------	-----

Liste des tableaux

Introduction

<u>Tableau N°1</u> : Quelques micro-organismes potentiellement rencontrés dans le lait cru de bovins et sources de contamination (Avis de l'AFSCA-15-2011).....	15
------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

Section expérimentale

Etude N°1

Tableau 1 : Antimicrobial residue screening results.....	39
----------------------------------------------------------	----

Etude N°2

Tableau 1: Milieux sélectifs pour l'isolement des bactéries.....	57
------------------------------------------------------------------	----

Tableau 2 : Illustration de la répartition des résultats	60
----------------------------------------------------------------	----

Tableau 3 : Résultats des enquêtes sur le mode de consommation.....	61
---------------------------------------------------------------------	----

Etude N°3

Tableau 1 : Mean values of bacteria isolated and encountered from the sites.....	80
----------------------------------------------------------------------------------	----

Tableau 2: Contamination of raw milk observed in the literature.....	85
----------------------------------------------------------------------	----

Discussion

Tableau 1: Niveaux de contamination du lait dans différents pays africains.....	122
---------------------------------------------------------------------------------	-----

Abréviations

ADN	: Acide Désoxyribonucléique
ARN	: Acide Ribonucléique
ASR	: Aérobie Sulfite reducteur
FCFA	: Francs de la communauté financière d'Afrique
INS	: Institut National de la Statistique
LABOCEL	: laboratoire central de l'élevage (Niamey, Niger)
ME	: Ministère de l'Élevage (Niger)
MEIA	: Ministère d'Élevage et des Industries Animales (Niger)
MRA	: Ministère des Ressources Animales (Niger)
OMS	: Organisation Mondiale de la Santé
ONG	: Organisation Non Gouvernementale
PCR	: Polymerase Chain Reaction
PIB	: Produit Intérieur Brut
RGAC	: Recensement Général de l'Agriculture et du Cheptel (Niger)
SDR	: Stratégie de Développement Rural
TAC	: Total Aerobic Count
UBT	: Unité Bétail Tropical
UE	: Union Européenne
UEMOA	: Union Economique et Monétaire Ouest Africain

Résumé – Abstract	2
Préambule général	6
Introduction	9
1. Titre section 1.1. Elements d’information générale sur le Niger.....	10
2. Titre section 1. 2. Production laitière au Niger	11
3. Titre section 1. 3. Microbiote du lait	15
4. Titre section 1. 4. Méthode de recherche des microorganismes et dosage des ATBS	22
Objectifs	27
Section expérimentale	29
Etude 1: Survey on the presence of antibiotics residus in raw milk in Niger	31
Etude 2: Microbiological quality of cow’s raw milk of sites in Niger.....	48
Etude 3: Microbiological biodiversity analysis of Nigerien raw milk through 16S amplicon sequencing	72
Etude 4: Comparative assessment of the microbial communities in raw milk produced from two villages of Niger.....	97
Discussion – perspectives	118
Références	133

Résumé - Abstract

Résumé

L'élevage est une activité importante dans l'agriculture au Niger. Ce secteur est confronté à d'énormes problèmes, tels que la faible productivité des animaux, la faiblesse des investissements, les difficultés d'alimentation et d'abreuvement et les problèmes sanitaires récurrents. Le Niger est un pays enclavé d'une superficie de 1 267 000 km², dont la frontière méridionale est à plus de 600 km de la mer (Golfe de Guinée) et, selon l'Institut National de la Statistique (INS), le pays compte 19 millions d'habitants. Au Niger, pays à dominante agro-pastorale, l'élevage est pratiqué par près de 87 % de la population active, soit comme activité principale, soit comme activité secondaire après la culture de céréales. L'élevage est un facteur déterminant dans le contexte de la sécurité alimentaire et de la réduction de la pauvreté. En moyenne, il contribue au revenu des ménages à un niveau de 15 % et à la sécurité alimentaire à un niveau de 25 %. Au Niger, les espèces animales qui fournissent le lait sont : les bovins, les chèvres, les camélidés et les moutons. Les principales races bovines impliquées dans la production laitière proviennent de plusieurs races locales issues de *Bos taurus* (Kouri) et de *Bos indicus* (Azawak, Bororo, Djelli, Goudali) et il existe principalement trois grands secteurs laitiers nationaux : périurbain, rural et le ranching. La production laitière moyenne est de 2,4 l / vache / jour en saison des pluies contre 2 litres en saison sèche et froide et 1,4 litres en saison sèche et chaude. L'analyse de l'évolution des habitudes alimentaires montre une tendance à l'augmentation de la consommation de produits laitiers en Afrique de l'Ouest, en particulier dans les zones urbaines, où les populations sans habitude de consommation laitière les ont rapidement adoptées. Le développement du secteur laitier nécessite une réelle prise en compte de la maîtrise des risques sanitaires pour assurer la santé du consommateur, la qualité et l'hygiène des produits. Un mauvais contrôle de l'hygiène est la principale source de contamination du lait puisque plusieurs agents pathogènes d'origine alimentaire peuvent être transmis par le lait cru dont il existe peu de données sur la qualité microbiologique au Niger. Ainsi, le microbiote du lait cru provenant de 3 centres de collecte (Kollo, Hamdallaye et Say) et de 3 fermes (Toukounous, Kirkissoye et Niamey) au Niger a été évalué selon deux méthodes, la microbiologie classique et la métagénomique. L'objectif de cette étude était de connaître la qualité microbiologique du lait cru produit au Niger et de la comparer avec des méthodes de production similaires dans d'autres pays. Pour ce faire, nous avons énuméré des indicateurs microbiologiques qui reflètent la qualité hygiénique et la sécurité du lait cru (coliformes, *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*) et nous avons ensuite effectué des analyses métagénomiques afin d'avoir une image globale du microbiote.

L'utilisation de l'analyse métagénomique a permis d'obtenir un aperçu des compositions bactériennes indigènes dans le but d'améliorer la sécurité et l'innocuité de ces produits. La qualité du lait cru a été estimée grâce à une technologie de séquençage à haut débit dénommée métagénomique de l'ADNr 16S (aussi appelée analyse métagénomique ciblant l'ADN ribosomique 16S). Pour affiner les

paramètres de qualité et de sécurité sanitaire du lait cru, la présence de résidus d'antibiotiques, ainsi que les niveaux de bactéries indicatrices d'hygiène et la présence de *Staphylococcus* coagulase positive ont été également déterminés. Les données recueillies dans le cadre de cette étude peuvent être utiles pour évaluer l'exposition des habitants du Niger aux micro-organismes pathogènes présents dans le lait.

Des échantillons ont été soumis à la microbiologie classique pour les dénombrements de la flore totale aérobie à 30 °C, le dénombrement de *St. aureus* et *E. coli* et des coliformes ; l'analyse métagénomique a été effectuée sur ces mêmes échantillons. Les amplicons d'ADNr 16S hypervariables V1-V3 ont été préparés pour chaque échantillon et séquencés avec la séquence MiSeq Illumina (kit V3). L'assignation taxonomique et le regroupement ont été effectués avec Mothur à l'aide de la base de données SILVA.

L'analyse métagénomique des données de séquençage pour la région V1-V3 de l'ADNr 16S a permis d'identifier les populations dominantes et d'évaluer leur abondance relative. Par ordre décroissant d'abondance, les phyla suivants ont été observés : *Protéobactéries*, *Firmicutes*, et *Actinobactéries*. Les principales espèces rencontrées étaient *Acinetobacter*, *Staphylococcus*, *Klebsiella*, *Escherichia*, *Lactobacillus*, *Lactococcus* et une partie de la population totale était composée d'isolats d'origine environnementale comme *Enhydrobacter* et *Kocuria*.

Le dépistage des résidus d'antibiotiques a été effectué à l'aide d'une trousse d'analyse biologique normalisée, le Delvotest[®]. Au total, sur les 192 échantillons de lait cru, 19 (9,9 %) étaient positifs.

Une enquête volontaire a été menée auprès des consommateurs de lait cru pour connaître les maladies d'origine alimentaire. D'après les réponses des consommateurs interrogés, un taux de 25 % de maladies d'origine alimentaire chez les personnes qui consomment directement du lait cru a été rapporté (194 enquêtés). Les résultats montrent que les règles d'hygiène ne sont pas respectées dans la production de lait cru, ce qui représente un risque dans le cas où le lait cru est directement consommé sans aucun traitement thermique avant consommation. Cela présente un risque grave pour la santé publique. En conclusion, la qualité du lait cru peut être améliorée en utilisant les bonnes pratiques d'hygiène pendant la traite, la collecte et le transport du lait cru et seul le traitement thermique du lait peut permettre de limiter les risques sanitaires pour les consommateurs.

Summary

Livestock breeding is an important activity in agriculture in Niger. This sector is facing huge problems, such as the weak productivity of the animals, the weak investment, the feeding and watering difficulty and the recurrent sanitary problems. Niger is a landlocked country with an area of 1,267,000 km², whose southernmost border is more than 600 km from the sea (Gulf of Guinea) and according to National Institute of statistics (INS), Niger has a population of 19,124,884. In Niger, which is a predominantly agro-pastoral country, breeding is performed by nearly 87% of the active population either as a main activity or as a secondary activity after agriculture. Breeding is a determining factor in the context of food security and poverty reduction. On average, it contributes to household income at a level of 15% and to food security at a level of 25%.

In Niger, the animal species supplying milk are: cattle, goats, camelids and sheep. The main cattle breeds involved in milk production come from several local breeds from *Bos taurus* (Kouri) and *Bos indicus* (Azawak, Bororo, Djelli, Goudali). There are mainly three major national dairy sectors, namely peri-urban, rural and ranching. The average milk production is 2.4 l/cow/day in the rainy season compared to 2 l in the dry and cold season and 1.4 l in the dry and hot season.

Analysis of the evolution of dietary pattern shows a tendency towards increased consumption of dairy products in West Africa, particularly in urban areas, where populations with no dairy consumption pattern have rapidly adopted them. The development of the dairy sector requires a real consideration of the control of health risks to ensure the health of the consumer, the quality and hygiene of the products. Poor hygiene control is the main source of contamination since several foodborne pathogens can be transmitted by raw milk. There are few data on the microbiological quality of raw milk in Niger. Therefore, the raw milk microbiota from three collection centres (Kollo, Hamdallaye and Say) and three farms (Toukounous, Kirkissoye and Niamey) in Niger have been evaluated using two methods, the classical microbiology and metagenetic. The objective of this study was to assess the microbiological quality of raw milk produced in Niger and compare it with similar production methods in other countries. To perform this, we enumerated microorganisms that indicates the hygiene quality and safety of raw milk (coliforms, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*) and then we performed metagenetics analyzes in order to obtain a global image of the microbiota. The use of metagenetic analysis aimed to get an insight of indigenous bacterial compositions and to enhance the safety and quality of raw milk with high-throughput sequencing technology through 16S rDNA metagenetics (also called metagenomics analysis targeting 16S ribosomal DNA). We wanted also to assess the presence of antibiotics residues, the levels of hygiene indicator bacteria and the occurrence of coagulase positive *Staphylococcus*. Data collected in this study may be useful for an exposure assessment of Niger inhabitants to foodborne pathogens present in raw milk. Samples were

submitted to classical microbiology for Aerobic Total Microbiological Counts (ATMC) at 30°C, the enumeration of coagulase positive *Staphylococcus* and *E. coli* (ECC) and total coliforms counts (TCC), while metagenetic analysis was performed on the same samples. V1–V3 hypervariable 16S rDNA amplicon libraries were prepared for each sample and sequenced with MiSeq Illumina sequence (V3 kit). Taxonomical assignment and clustering were performed with Mothur using SILVA database.

Metagenetic analysis of sequencing data for the V1-V3 region of 16S rDNA resulted in the identification of dominant populations and in the evaluation of their relative abundance. In descending order of abundance, the following phyla were recovered: *Proteobacteria*, *Firmicutes* and *Actinobacteria*. The main species encountered were *Acinetobacter*, *Staphylococcus*, *Klebsiella*, *Escherichia* spp, *Lactobacillus* spp, *Lactococcus* spp and a part of the whole population was composed of isolates issued from environmental origin, as *Enhydrobacter* spp and *Kocuria* spp. Taxonomical assignment and clustering were performed with Mothur using SILVA database.

Screening of antibiotic residues was performed using a standardized biological test kit form, the Delvotest®. In total, of the 192 samples of raw milk, 19 (10.1%) were positive. A voluntary survey of raw milk consumers was performed to learn about foodborne disease. Following the answers of interviewed consumers, a rate of 25% foodborne illness among people who consume raw milk directly out of 194 survey respondents was detected.

The results show that hygiene rules are not respected in the production of raw milk and that raw milk is directly consumed without any heat treatment before consumption. This presents a serious public health risk. In conclusion, the quality of raw milk can be improved by using the good hygiene practice during milking, collection and transport of raw milk and only the heat treatment of the milk can help to limit health risks for consumers.

Préambule général

Le Niger, qui avait environ 2,5 millions d'habitants en 1950, en compte aujourd'hui 19 millions. Sa population atteindrait 69 millions en 2050, soit plus que celle de la France actuellement, selon la projection moyenne de l'Organisation des Nations unies (ONU). Cette explosion démographique s'explique par un taux de fécondité très élevé. Dans ce contexte, il faut améliorer le potentiel agricole et plus particulièrement la production animale.

Au rang des produits animaux consommés figure le lait, produit à haute valeur marchande aussi bien localement qu'à l'échelle internationale. Les avancées technologiques, les politiques commerciales, les stratégies de capacité productive et les crises alimentaires ont façonné les filières laitières et modulé les habitudes de consommation des produits laitiers. La production laitière constitue un élément essentiel de la construction d'une souveraineté alimentaire.

L'organisation actuelle de la collecte, restée informelle, se révèle cependant peu adaptée à cette demande nouvelle des laiteries, en termes de quantité, régularité et qualité. L'augmentation du niveau de la production laitière et l'amélioration de la qualité hygiénique du lait produit sont, entre autres, de grands défis auxquels sont confrontés les élevages bovins laitiers. Dans le contexte du Niger, où la traite se fait manuellement, la notion de mesures d'hygiène à la traite doit se focaliser essentiellement sur l'hygiène des trayeurs, sans oublier cependant la glande mammaire et le lait.

Le développement du secteur laitier nécessite une véritable prise en compte de la maîtrise des risques sanitaires pour garantir la santé du consommateur et la qualité des produits qui lui sont destinés. En effet, beaucoup de maladies bactériennes peuvent être transmises par le lait.

Notre travail s'inscrit dans cette perspective. La population bovine du Niger est estimée à plus de 12 millions de têtes. La faiblesse du système de réglementations et des structures de contrôle de la qualité des produits, ne permettent pas d'assurer une qualité hygiénique suffisante des produits laitiers. Ce problème est amplifié par les conditions climatiques car la chaleur et parfois l'humidité ambiante ne favorise pas la conservation du lait. Si quelques travaux assez récents dans le contexte urbain nigérien sur la qualité du lait et des investigations microbiologiques ont permis de mieux comprendre le fonctionnement de la filière lait, il n'en demeure pas moins qu'ils nécessitent des approfondissements. Les pratiques de production et de commercialisation du lait sont à l'origine de sa mauvaise qualité microbiologique et certaines habitudes de consommation du lait cru représentent un risque pour la santé des consommateurs. Cette amélioration implique également la connaissance hygiénique et microbiologique du lait cru.

L'objectif général de notre travail est de contribuer à l'amélioration de la production laitière au Niger à travers l'amélioration de la qualité hygiénique et microbiologique du lait cru mais aussi par une meilleure compréhension de la biodiversité microbienne.

Nos hypothèses et objectifs spécifiques liés à cet objectif général sont :

La qualité microbiologique et chimique constitue un élément clé d'amélioration de la qualité du lait surtout consommé cru.

Notre premier objectif spécifique a été de dresser un état des lieux quant à la présence de résidus d'antibiotiques dans le lait cru au Niger.

La qualité sanitaire dépend des caractéristiques microbiologique et hygiénique du lait cru. Partant de ce constat, notre second objectif spécifique a été d'évaluer la qualité microbiologique du lait par dénombrement des *E. coli*, des coliformes et des *St. aureus* à coagulase positive.

La qualité microbiologique dépend de la connaissance de la biodiversité microbienne. Ainsi donc, notre troisième objectif spécifique a été d'apprécier la diversité microbienne des laits de vaches issus de six sites dont 3 fermes (Toukounous, Kirkissoye et Niamey) et 3 centres de collecte de lait (Hamdallaye, Kollo et Say) et enfin notre dernier objectif est de comparer cette dernière à travers la métagénomique.

Notre travail s'articule autour de trois parties.

La première partie (**INTRODUCTION GENERALE**) vise à contextualiser les données nécessaires à la compréhension des objectifs poursuivis et des résultats obtenus.

La seconde partie (**TRAVAIL EXPERIMENTAL**) est composée des quatre publications suivantes concrétisant les réponses aux hypothèses de travail:

1. Amadou Morou Madougou, Caroline Douny, Nassim Moula, Nana Barira Laminou, Marie Louise Scippo, Véronique Delcenserie, Georges Daube, Marichatou Hamani, Nicolas Korsak (2019). Survey on the presence of antibiotic residues in raw milk by using Delvotest in Niger soumis et accepté pour publication dans la revue Veterinary world. Doi:www.doi.org/10.14202/vetworld.2019.1970-1974.
2. Amadou Morou Madougou, Issa Hamadou, Nassim Moula, Sébastien Crevecoeur, Véronique Delcenserie, Georges Daube, Marichatou Hamani, Nicolas Korsak (2019). Qualité microbiologique du lait cru de vache de la zone péri-urbaine de Niamey (Niger) en cours de préparation et sera soumis pour publication dans la revue European Scientific Journal.
3. Amadou Morou Madougou, Bernard Taminiau, Véronique Delcenserie, Georges Daube, Marichatou Hamani, Nicolas Korsak (2019). Microbial biodiversity analysis in Niger raw milk through metagenetics soumis pour publication dans la revue Journal of Food Protection.
4. Amadou Morou Madougou, Bernard Taminiau, Véronique Delcenserie, Georges Daube, Marichatou Hamani, Nicolas Korsak (2019). Raw milk microbiota: Comparative study of two collection centres (Hamdallaye and Kollo) in Niger soumis pour publication dans la revue International journal of veterinary medicine.

La troisième partie (**CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS**) présente les principaux enseignements à tirer des études réalisées et leurs implications pratiques.

Introduction

1.1. Eléments d'information générale sur le Niger

Le Niger est un pays sahélien d'Afrique Occidentale couvrant une superficie de 1 267 000 km². Il est limité à l'ouest par le Mali et le Burkina Faso, au sud par le Nigéria et le Bénin, à l'est par le Tchad et au nord par l'Algérie et la Libye (**Figure 1**). Le cadre administratif du Niger est divisé en 8 régions, 36 départements et 265 communes (52 urbaines et 213 rurales).

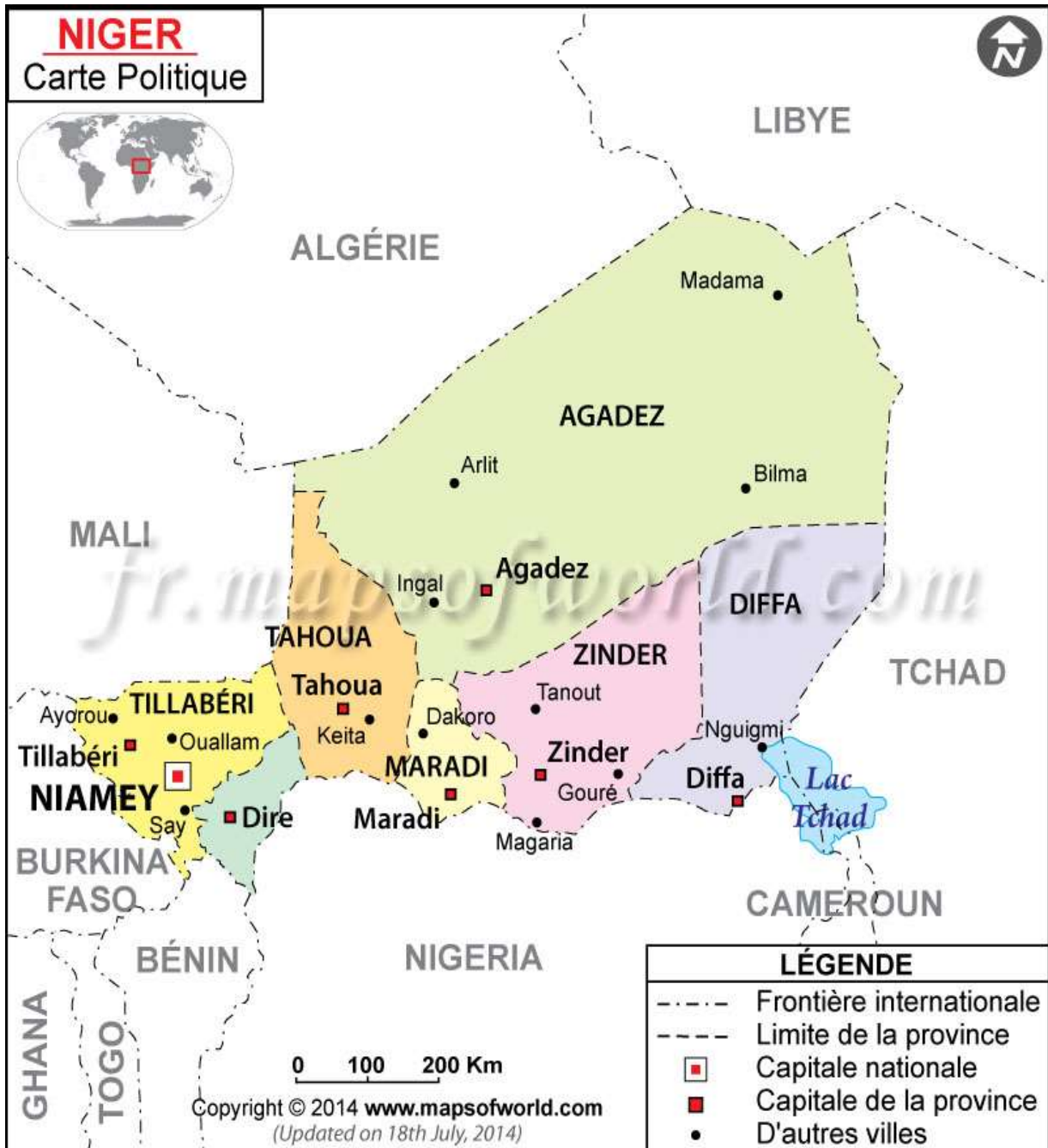


Figure 1: Carte administrative du Niger avec les pays limitrophes (Source : mapsofworld.com)

La population est estimée à 19 millions habitants dont 49,79 % d'hommes et 50,21 % de femmes avec une densité de 16,3 habitants/km² (INS, 2016). La population du Niger se compose de plusieurs ethnies dont les Haoussas (54,1 %), les Djerma (21,1 %), les Touaregs (9,9 %), les Peuls (9,2 %), les Kanouri (4,6 %), les Arabes (0,4 %), les Gourmantchés (0,3 %) et les Toubous (0,4 %) (INS, 2016).

Au niveau de sa population, le Niger a un taux d'accroissement annuel de 3,9 %, largement supérieur à celui de la production agricole, ce qui aggrave le déficit alimentaire. Le climat est de type sahélien avec une saison pluvieuse de courte durée (juin à septembre) et une saison sèche (octobre à mai) pendant laquelle alternent une période froide avec des températures journalières moyennes variant entre 10 et 20 °C, et une période chaude avec des températures pouvant atteindre 40 °C. Les précipitations moyennes annuelles varient entre 0 mm à 800 mm, du nord (très désertique) au sud.

L'élevage se pratique sur plus de 620 000 km² de terres pâturables réparties dans les zones pastorales (370 000 km²) et les zones agricoles (250 000 km²). Avec un cheptel estimé à 42 millions de têtes toutes espèces confondues dont 12 millions de bovins (Figure 2), 11 millions de ovins, 15 millions de caprins, 1 million de camelins, 246 mille d'équins et 1 million d'asins (INS, 2016). L'élevage joue un rôle très important dans l'économie du pays, et est pratiqué par près de 87 % de la population active soit en tant qu'activité principale, soit comme activité secondaire après les cultures (MEIA, 2004). Son apport aux revenus des ménages est en moyenne de 15 % et satisfait 25 % des besoins alimentaires (MEL, 2003).

Cependant, l'élevage extensif largement répandu au Niger n'arrive pas à procurer dans des conditions économiques satisfaisantes la viande et le lait nécessaires à l'ensemble des populations concernées. Néanmoins, il constitue un atout important pour le développement socio-économique du Niger, du fait que la demande à l'exportation, principalement en direction du Nigeria, est en croissance. Aujourd'hui, l'essentiel du commerce d'exportation concerne des animaux sur pied, la transformation étant très peu réalisée (Rhissa, 2010).

La vente du lait constitue le maillon central des activités génératrices de revenu de ce secteur qui permettent de lutter contre la pauvreté (Issa, 2015).

1.2. La production laitière au Niger

Les filières laitières constituent l'ensemble des agents économiques qui contribuent directement à la production, la collecte, la transformation, la distribution et la consommation du lait. Selon la FAO, la production laitière au Niger a été estimée à 1.043.080 tonnes (FAO, 2017). Ce lait est destiné à l'alimentation des veaux, à l'autoconsommation des ménages, à la transformation en lait caillé pour la conservation, et à la vente directe ou à destination des collecteurs. En cas de

surproduction, notamment pendant l'hivernage, la transformation du lait (fromage, beurre) est très développée surtout si les troupeaux sont loin des marchés (MRA, 2007). Il existe principalement 3 grandes filières laitières nationales : Péri-urbaine, rurale et les Ranchings. Les péri-urbaines existent dans les grandes villes du Niger. Elles sont animées par des éleveurs laitiers périurbains, un réseau de collecteurs et des unités de transformation artisanales, semi-modernes ou modernes. Les rurales très présentes dans les zones agricoles et agropastorales, exploitent le bétail des agroéleveurs et des éleveurs transhumants mais l'éloignement des centres de consommation et l'absence d'un réseau de collecte obligent ces filières à se spécialiser dans la transformation du lait (beurre, lait caillé, ...). Enfin, il existe les « ranchings » (des centres de multiplication de bétail) qui ont été mis au point par l'Etat et qui approvisionnent en lait certaines unités de transformation (Marichatou and Kore, 2005).

La production moyenne est de 2,44 l/vache/jour en saison pluvieuse (SP) contre 2 litres en saison sèche et froide (SSF) et 1,44 litres en saison sèche et chaude (SSC). La fraction vendue est de 68 % et celle autoconsommée de 32 % (Marichatou and Kore 2005 ; Boukary et al., 2005). Les statistiques récentes indiquent que l'Afrique possède 16,5 % du cheptel bovin mondial, mais que la production laitière ne représente que 4,6 % de la production laitière mondiale (Hanzen et al., 2013). L'analyse de l'évolution des habitudes alimentaires montre une tendance à l'accroissement de la consommation des produits laitiers en Afrique de l'Ouest, notamment en milieu urbain, où des populations n'ayant pas d'habitude de consommation de produits laitiers les ont rapidement adoptées (Broutin et al., 2002).

En Afrique, la consommation laitière y est également bien moins élevée (36 kg par habitant/an) que la moyenne mondiale (103 kg par habitant/an) ou européenne (294 kg par habitant/an) (Hanzen et al., 2013).

Pour les projections de la demande en lait au Niger, l'hypothèse tient compte à la fois de consommations moyennes actuelles de 30 litres par personne et par an et d'une croissance moyenne de la population nigérienne dans les années à venir de l'ordre de 3,9 % (FAO, 2017). Pour l'ensemble des pays de l'Union Economique et Monétaire Ouest Africaine (UEMOA), la production laitière annuelle est estimée à près de 3 millions de tonnes, dont 42 % de lait de vache, 35 % de lait de chèvre, 13 % de lait de chamelle et 10 % de lait de brebis (FAO, 2012). Composante essentielle du régime alimentaire des populations pastorales et agro-pastorales, le lait est aussi une source régulière de revenus. Dans les pays sahéliens, le lait contribue ainsi à 3,5 et 11 % du chiffre d'affaires agricole (UEMOA, 2002).

La consommation de lait est très variable selon les zones de production, selon les saisons et selon les groupes ethniques. En zone nomade, le lait est presque l'alimentation de base de certaines populations, chez lesquelles la consommation est de 1 à 3 litres par personne et par jour en fonction de la disponibilité en lait. La différence entre les villes et les campagnes s'explique par

l'autoconsommation de lait cru au niveau des éleveurs et montre bien la difficulté d'approvisionnement en lait (lait cru ou lait importé) pour les villes (SDDE, 2013).

Signalons aussi l'irrégularité de la production selon les saisons, liée à la disponibilité irrégulière du fourrage (en saison sèche). Ce déficit est le fait de pratiques d'élevage qui restent encore peu efficaces, de la faible productivité de ces élevages et du faible potentiel laitier des races locales (Garba, 2016).

Le Niger dispose de plusieurs races locales bovines *Bos taurus* (Zébus, Kouri) et *Bos taurus indicus* (Azawak (1), Bororo (2), Djelli (3), Goudali (4)). A ce jour, *Bos taurus indicus* est considérée comme une sous-espèce de *Bos taurus*, étant donné que les hybrides sont fertiles. Ce cheptel assure une partie de la production laitière. Les zébus ont une bosse au niveau du garrot et sont le plus souvent rencontrés en zone sèche (Garba, 2016) (figure 2).



Source : Issa Hamadou et Amadou M Madougou



Bos taurus : Kouri

Source : Issa Hamadou et Amadou M Madougou

Figure 2 : Les principales races bovines du Niger

1.3. Microorganismes du lait

Divers micro-organismes peuvent être retrouvés dans le lait cru. Les bactéries sont les plus rencontrées mais des levures, des moisissures, des virus et divers protozoaires peuvent également être présents. Ces germes diffèrent notamment par leur taille et leur niveau de complexité (Quigley et al., 2013 ; Desmasures et Gueguen, 1997). La croissance des micro-organismes peut être influencée par divers facteurs du milieu ou de l'environnement comme le pH, la température, la quantité d'eau libre (a_w), la concentration en nutriments, ainsi que la présence de substances antimicrobiennes (Quigley et al., 2013). Les microorganismes du lait cru sont souvent abordés sous l'angle technologique. En effet, ils jouent un rôle non négligeable en transformation fromagère du lait cru et sont communément classés en microflore d'intérêt technologique, microflore d'altération, et microflore potentiellement pathogène (Tormo, 2010). (Tableau 1).

Tableau 1. Quelques micro-organismes potentiellement rencontrés dans le lait cru de bovins et sources de contamination (Avis de l'AFSCA-15-2011)

	Passage direct dans le lait à partir du sang (infection systémique)	Mammites	Contamination fécale (contamination externe du lait durant ou après la traite) contamination à partir de la peau	Environnement
Bactéries pathogènes				
<i>Salmonella</i> spp.	x	x	x	x
<i>Brucella abortus</i>	x	x		x
<i>Mycobacterium bovis</i>	x		x	x
<i>E. coli</i> pathogènes pour l'homme			x	x
<i>Listeria</i>	x	x	x	x

<i>monocytogenes</i>				
<i>Staphylococcus aureus</i> produisant des entérotoxines		x		x
Virus pathogènes				
Virus de la fièvre de la vallée du Rift	x			
Parasites pathogènes				
<i>Cryptosporidium parvum</i>			x	x
Toxines				
Toxines de <i>Clostridium botulinum</i> de type B	Toxine (x)		x (spore)	x (spore)

1.3.1. Les bactéries

1.3.1.1. Les bactéries lactiques

Les bactéries lactiques sont des bactéries Gram + produisant de l'acide lactique par fermentation de glucides simples tels que le lactose. Elles se développent généralement dans des conditions anaérobies voire anaérobies facultatives et jouent un rôle majeur dans l'acidification du lait et dans les équilibres microbiens du lait (Klaenhammer et al., 2005 ; Quigley et al., 2013). Elles constituent un moyen biologique efficace pour la préservation des qualités hygiéniques des aliments du fait de leur aptitude inhibitrice vis-à-vis des micro-organismes nuisibles (Tormo, 2010 ; Caridi et al., 2003). En effet, les bactéries lactiques produisent de nombreux métabolites aux propriétés antimicrobiennes comme des acides organiques, du peroxyde d'hydrogène, du dioxyde de carbone, de la reutirine, du diacétyl et des bactériocines (Dortu et Thonart, 2009 ; Quigley et al., 2013).

La flore lactique peut être opportuniste étant donné que les bactéries lactiques ont aussi été isolées dans des prélèvements pathologiques (Tormo, 2010 ; Casalta et Montel, 2008 ; Ogier et Serror, 2008). Ces bactéries lactiques sont principalement constituées de Lactocoques, *Leuconostoc*,

Pédiocoques, Streptocoques thermophiles, Lactobacilles mésophiles et thermophiles et Entérocoques (Quigley et al., 2013; Casalta et Montel, 2008; Beuvier et al., 1997).

- **Lactobacilles**

Les lactobacilles sont de bons producteurs d'acide lactique et parfois de substances antibactériennes. Ils contribuent grandement à l'équilibre des microflores. En effet, ils ont un rôle inhibiteur vis-à-vis du développement de microorganismes pathogènes (Lafarge, 2006 ; Tormo, 2010). D'autres lactobacilles sont considérés comme des pathogènes opportunistes (*L. cateniformis*, *L. crispatus*, *L. gasseri*) notamment impliqués dans les infections urinaires alors qu'ils sont des commensaux reconnus au niveau vaginal par exemple. *L. buchneri* a été incriminé dans des intoxications alimentaires, du fait de la production, dans des fromages, d'histamine pouvant être hautement allergène chez certains individus (Tormo, 2010 ; Quigley et al., 2013).

1.3.1. 2. Les Pseudomonas

Ce sont généralement des bactéries psychrotrophes, capables de se développer à 7 °C ou moins, indépendamment de leur optimum de croissance. En fait, la température minimum d'activité métabolique des psychrotrophes est proche de -10 °C. Le genre *Pseudomonas* renferme des bacilles Gram négatif, droits ou légèrement incurvés, de 0,5 à 1,0 µm de diamètre sur 1,5 à 5,0 µm (ou plus) de longueur, non sporulés. Généralement mobiles grâce à un ou plusieurs flagelles polaires, aérobies, à métabolisme strictement respiratoire, ils utilisent l'oxygène comme accepteur final d'électrons (les nitrates sont parfois utilisés comme accepteur d'électrons, ce qui permet une croissance en anaérobiose). Ils sont chimioorganotrophes, présentant une activité catalase, et généralement une activité oxydase, non producteurs d'indole et d'acétone et ils ne se cultivent pas à un pH inférieur à 4,5 (Lafarge, 2006, Quigley et al., 2013).

Les *Pseudomonas* sont subdivisées en deux groupes : le groupe de « *Pseudomonas aeruginosa* » et le groupe de « *Pseudomonas pertucinogena* » (FAO, 1998 ; Tormo, 2010).

1.3.1.3. Les Micrococcaceae

Ce sont des bactéries Gram +, qui ont une forme sphérique, généralement non mobiles et qui peuvent se développer en présence de 5 % de NaCl. On distingue 2 genres importants dans cette famille à savoir, les *Microcoques* et les *Staphylocoques*. Les principaux microcoques du lait sont *Micrococcus varians*, *Micrococcus luteus* et *Micrococcus sedentarius* ainsi que d'autres espèces en quantité moins importante (Bérodier et Spinnler, 2011).

1.3.1.4. Les staphylocoques

Ces coques Gram positif, caractérisés par une activité catalase, anaérobies facultatifs (meilleure croissance en aérobiose) et non mobiles, sont souvent regroupés en amas ou en grappe, parfois en paires ou en tétrades. La plupart des souches peuvent se développer en présence de 10 % de NaCl et à des températures comprises entre 10 et 40 °C. Ils peuvent produire des acides à partir de différents sucres comme le glucose et le lactose. Les études d'hybridation ADN-ADN ont permis de classer les espèces en différents groupes phylogénétiques (Kloos et Wolfshohl, 1991 ; Takahashi et al., 1999).

Ils sont principalement représentés par *Staphylococcus aureus*, pathogène présent dans le lait cru. L'origine principale de cette contamination est l'excrétion de *S. aureus* par des animaux laitiers atteints de mammites (Ibrahim, 2015 ; Sissao et al., 2015 ; Tormo, 2010). Cette bactérie est responsable d'une proportion importante des mammites subcliniques et chroniques chez la vache laitière, comme chez les petits ruminants et d'environ un tiers des mammites cliniques. Ces infections de longue durée sont parmi les plus difficiles à guérir par l'antibiothérapie et sont donc fréquentes. D'autre part, la colonisation de la peau, des muqueuses (notion de porteurs sains) et l'infection des lésions superficielles des trayons par *S. aureus* constituent également des sources de contamination du lait dont l'importance est mal connue. L'homme ayant des plaies contaminées ou des abcès peut être également un vecteur, y compris en tant que porteur sain (portage nasal). Selon une étude menée par Lamprell (2003), le biotype A humain est détecté dans moins de 3 % des échantillons de laits et de fromages analysés (Tormo, 2010).

Certaines de ces bactéries, productrices de coagulases et/ou d'entérotoxines sont potentiellement pathogènes, expliquant une classification dans le groupe 2 (OMS). On distingue 6 espèces à activité coagulase : *S. aureus*, *S. intermedius*, *S. schleiferi* subsp. *coagulans*, *S. delphini* et *S. lutrae*, et certaines souches de *S. hyicus*. Les espèces restantes n'ont pas d'activité coagulase et celles qui sont résistantes à la novobiocine sont considérées comme des espèces d'origine animale (animaux de ferme), plutôt que des espèces d'origine humaine (Nahaie et Hajek, 1984).

En ce qui concerne les Staphylocoques non pathogènes, on parle ici de staphylocoque à coagulase négative. Dans ce contexte, *Staphylococcus xyloxy* est la plus abondante dans le lait. Ils possèdent également une activité protéolytique et ont donc un rôle dans la maturation du lait cru (Delgado, 2003).

1.3.1.5. Les autres bactéries présentes dans le lait cru

- **Les coliformes**

Le terme de coliformes désigne traditionnellement un certain nombre d'espèces appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae*, capables de fermenter rapidement le lactose en produisant de l'acide et du gaz. On distingue les coliformes fécaux, issus de l'intestin de l'être humain et des animaux, et les coliformes non fécaux, provenant de l'environnement. Les coliformes induisent un risque de gonflement précoce des produits laitiers dû à la synthèse de CO₂ et d'hydrogène, mais ils induisent également des problèmes d'égouttage (FAO, 2011). Les coliformes sont des bacilles Gram négatif, non sporulés, sans activité oxydase, aérobies ou anaérobies facultatifs, capables de se multiplier en présence de sels biliaires et de fermenter le lactose avec production d'acide et de gaz en 48 heures à une température de 35-37 °C. Ce groupe comprend classiquement les huit espèces suivantes : *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes*, *Citrobacter freundii*, *Citrobacter diversus*, *Citrobacter amalonaticus*. Les apports de la taxonomie génétique et numérique ont modifié la classification des entérobactéries et augmenté considérablement le nombre d'espèces affiliées aux coliformes. Il s'agit de nouvelles espèces dans les genres *Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter* ou d'espèces anciennement décrites, comme *Yersinia enterocolitica*, non rattachées précédemment aux *Enterobacteriaceae*, ou de nouveaux genres tels que *Buttiauxella*, *Cedecea*, *Leclercia*, *Rahnella*. Parmi les coliformes, il faut distinguer les coliformes thermotolérants (croissance à 44 °C) ou fécaux provenant de l'intestin de l'être humain et des animaux, des autres coliformes qui sont considérés comme environnementaux. Pour la majorité des espèces de coliformes, le réservoir est aqua-tellurique, d'une part, animal et humain, d'autre part. Plus de la moitié de ces espèces, isolées de terres vierges et d'eaux d'alimentation potables n'ont jamais été impliquées dans des processus pathologiques. La microflore Gram négative représente une part importante de la population microbienne des laits fortement contaminés (Richard, 1983). Cependant, les mesures d'hygiène mises en œuvre durant ces 20 dernières années ont abouti à des niveaux des microflores nettement plus bas, et en particulier pour les coliformes qui sont souvent des indicateurs d'hygiène defectueuse (en particulier les coliformes thermotolérants). Cependant, les coliformes thermotolérants sont considérés comme des indicateurs de contamination fécale, c'est-à-dire que leur présence souligne un risque potentiel de présence de pathogènes entériques comme les salmonelles. Par ailleurs, certains sont des opportunistes et peuvent induire des infections chez l'homme. Véhiculés dans le lait de façon accidentelle lors de la traite, leur ingestion peut être à l'origine d'intoxications alimentaires. Ainsi, certaines souches d'*Escherichia coli* produisent des toxines qui provoquent des diarrhées. D'autres souches sont considérées comme hautement pathogènes (*E. coli* O 157 : H7) et peuvent provoquer des complications rénales et hémorragiques (Tormo 2010 ; Quigley et al., 2013 ; Kim et al., 2017 ; Li et al., 2018).

- **Les bactéries sporulées**

Les bactéries sporulées appartenant au genre *Bacillus* sont susceptibles d'altérer les produits laitiers pasteurisés en raison de la persistance de leurs spores après traitement thermique. Certaines bactéries, comme *Bacillus cereus*, sont aussi redoutées en raison des risques qu'elles présentent pour la santé du consommateur. Ces risques sont cependant limités dans le cas du lait.

Les spores butyriques de bactéries de type *Clostridium* peuvent entraîner des défauts comme le gonflement tardif des fromages avec apparition de trous dans la meule, ainsi qu'un goût et une odeur désagréable. En effet, le développement de ces bactéries, pouvant résister à des hautes températures grâce aux spores, entraîne une fermentation butyrique avec production d'acide butyrique, d'hydrogène et de CO₂ (lafarge, 2006 ; Namegi, 2006).

1.3.2. Les champignons

1.3.2.1. Les levures

Ce sont des microorganismes ubiquistes. Les levures constituent une classe d'eucaryotes unicellulaires. Elles appartiennent à l'embranchement des ascomycètes et des basidiomycètes. Les levures ascomycètes peuvent, sous certaines conditions, former des ascospores à l'intérieur de la cellule, alors que les levures basidiomycètes développent des spores externes. Les levures peuvent se diviser soit par bourgeonnement comme pour *Saccharomyces*, soit par division comme *Shizosaccharomyces*, par exemple. Dans certaines conditions, des espèces peuvent pousser sous forme de filaments irréguliers (exemple: *Candida albicans*, *Yarrowia lipolytica* ...). Les levures ont été identifiées par exemple dans les eaux polluées et les ensilages. Ils peuvent se développer, par exemple, sur la peau des hommes et des animaux, dans l'intestin, dans l'appareil respiratoire (Tormo, 2010 ; Quigley et al., 2013). Dans le lait cru, on trouve une très grande variété de genres et d'espèces de levures. On peut citer par exemple : *Kluyveromyces lactis*, *Debaryomyces*, *Candida* (*Candida famata*, *kefyr*, *curvata*), *Pichia* (Lafarge, 2006 ; Tormo, 2010 ; Ceugnez et al., 2015).

1.3.2.2. Les moisissures

Les moisissures intéressent un grand nombre d'autres produits laitiers comme le fromage et nécessitent un substrat et de l'oxygène pour se développer. Elles ont un impact sur les caractéristiques sensorielles des fromages. Les moisissures se retrouvent fréquemment dans les laits, mais leur niveau moyen ne dépasse pas 10 ufc/ml (Michel et al., 2001 ; Tormo, 2010). Peu d'études portent sur la diversité des espèces de moisissures contenues dans les laits, du fait notamment de la difficulté d'identification des différentes espèces (Tormo, 2010). Les *Mucor*, *Rhizopus*, *Aspergillus* sont les principaux genres responsables d'altérations du lait cru (Namegi, 2006).

1.3.3. Microflore pathogène

La contamination du lait et des produits laitiers par les germes pathogènes peut être d'origine endogène, suite à une excrétion mammaire de l'animal malade. Elle peut aussi être d'origine exogène, il s'agit alors d'un contact direct avec des troupeaux infectés ou d'un apport de l'environnement (Brisabois et al., 2000). Les bactéries les plus importantes de cette flore pathogène sont le plus souvent mésophiles et les principaux microorganismes pathogènes associés aux produits laitiers sont : *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus*, *Yersinia enterocolitica*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Campylobacter jejuni*, *Shigella sonnei* (Brisabois et al., 2000). Concernant la tuberculose bovine au Niger, les principaux facteurs de risque identifiés sont la consommation de lait non pasteurisé (91 %), le manque d'hygiène au sein des ménages (32-74 %), la présence d'animaux souffrant de toux chronique (4,7 %) et l'absence de la pratique de la quarantaine (4,2 %). La prévalence réelle de la brucellose a varié entre 11,8 et 13,8 % au niveau des troupeaux alors que la prévalence réelle individuelle était de 1,3 % (Boukary, 2013).

L'origine de leurs caractères pathogènes est liée à la production de toxine mais aussi à une hygiène défectueuse (ANSES, 2013).

1.3.4. Intérêt de l'étude des micro-organismes du lait

1.3.4.1. Intérêt hygiénique

L'examen microbiologique permet d'évaluer le niveau de contamination des denrées alimentaires et de déterminer la nature de leur microflore, plus communément appelé microbiote. Il est d'un très grand intérêt dans le cadre du contrôle officiel ainsi que pour les autocontrôles mis en œuvre par les industriels pour garantir la salubrité des denrées qu'ils commercialisent. Il est donc indispensable d'analyser le produit afin d'en déterminer le contenu et mettre le consommateur à l'abri de toute éventualité pouvant porter préjudice à sa santé (Thieulin et al., 1947 ; Delcenserie et al., 2014).

1.3.4.2. Intérêt nutritionnel

En Europe, les critères microbiologiques officiels sont définis dans le Règlement (CE) n° 2073/2005 (CE, 2005). Le lait ou les produits laitiers contaminés par certains micro-organismes protéolytiques ou lipolytiques, perdent une partie de leurs valeurs nutritionnelles, due à la dénaturation des protéines et des vitamines, d'où l'intérêt de l'étude des micro-organismes qui permet de les éviter au maximum afin de conserver au lait de consommation toutes ses vertus nutritionnelles.

1.3.4.3. Intérêt technologique

Toute denrée alimentaire, de la fabrication à la conservation, est conditionnée par la qualité microbiologique de la matière première. Dans le cas du lait, on préconise une utilisation précoce du froid, car un lait placé à basse température se caractérise par un accroissement de sa stabilité, un ralentissement du développement microbien pour la flore de contamination, et une inhibition de la flore pathogène. Cependant, certaines bactéries Gram + sont généralement plus résistantes à ce stress que d'autres Gram -. Le maintien au froid permet de ralentir la croissance des micro-organismes mais ne les tue pas. Les microorganismes sont normalement détruits à des températures supérieures à 60 °C. Cependant, certains microorganismes produisent des spores qui les protègent de la chaleur (Gelinas, 2001). L'acidification permettrait l'élimination de certains micro-organismes dont les salmonelles et les coliformes. Son efficacité, vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* et de ses toxines n'est pas prouvée (Namegi, 2006). Tous les microorganismes pathogènes qui peuvent être transmis par les aliments et les espèces de microorganismes capables d'altérer les aliments sont à considérer. Il en est de même pour les produits toxiques résultant de la présence des micro-organismes (toxines, métabolites toxiques) (Fleming, 2014).

1.4. Méthodes de recherche des microorganismes, détection et dosage des résidus d'antibiotiques dans le lait

Comme cela a été mis en évidence dans le chapitre précédent, dans les pays de l'UEMOA, les méthodes utilisées pour la détection des résidus des médicaments vétérinaires sont différentes d'un pays à l'autre et même d'un laboratoire à l'autre, du fait de l'inexistence de méthodes normalisées et homologuées par l'UEMOA (Mensah et al, 2014). En général, le contrôle des résidus comprend deux étapes : l'étape de la détection des résidus avec des méthodes sensibles (faible taux de résultats « faux négatifs ») et l'étape de confirmation nécessitant une quantification par rapport à la LMR et une identification avec un faible taux de résultats « faux positifs ».

1.4.1. Méthode de détection (screening) et confirmation par dosage des antibiotiques dans les denrées alimentaires

L'inhibition de la croissance d'une espèce de bactérie est la résultante des méthodes microbiologiques de détection des antibiotiques. Les méthodes de détection des antibiotiques utilisent la sensibilité de certaines souches vis-à-vis d'un ou de plusieurs antibactériens (Mouillet et al., 1980). Il existe plusieurs méthodes microbiologiques de détection rapide des résidus des médicaments vétérinaires dans le lait : Méthode des quatre boîtes, Méthode STAR, Delvotest® T (figure 3), Méthodes immunologiques, Dosages radio-immunologiques (RIA), Épreuve immuno-enzymatique (ELISA), Méthode enzymatique. Bien que ces méthodes aient de larges spectres de détection des résidus d'antibiotiques, elles ne sont pas toutes spécifiques. Actuellement, tout test microbiologique de

screening doit suivre la procédure de validation établie par le “Laboratoire Européen de Référence (EURL)” (CRLs, 2010). Concernant les résidus d’antibiotiques, c’est le laboratoire de l’Agence nationale de sécurité sanitaire de l’alimentation, de l’environnement et du travail (ANSES) à Fougères (France) qui est le laboratoire européen de référence (EURL) (Alamedji et al., 2008 ; Edder et al., 2006 ; Ben, 2007 ; Valerie, 2004 ; Scippo et al., 2006 ; Valerie, 2013; Diop, 2003).

Pour éviter le risque de doute aux résultats à diverses interférences possibles au moment des tests de screening, les résultats doivent impérativement être confirmés par une méthode d’analyse qui va permettre une identification univoque et une quantification du composé responsable du résultat positif. Ces tests sont essentiellement physico-chimiques, plus sélectifs et plus sensibles que les méthodes microbiologiques car ils permettent d’identifier les molécules séparément et donc évitent les problèmes d’interférences possibles entre les substances. L’HPLC (chromatographie liquide haute performance) avec ionisation électro-spray à pression atmosphérique (ESI en anglais) et couplée avec la spectrophotométrie de masse (HPLC-ESI-SM), est souvent utilisée pour identifier et doser les résidus de chloramphénicol dans les aliments (Delepine et al, 2002). L’HPLC avec ionisation chimique à pression atmosphérique encore appelée la HPLC-APCI ou GC est également utilisée (Combs et al, 1999). En Europe, la spectrométrie de masse associée à la chromatographie liquide (LC-MS/MS) est la méthode officiellement reconnue pour la confirmation et l’identification des antibiotiques selon la décision de la commission 2002/657/CE (Commission Européenne, 2001).

Figure 3 : l’appareil delvotest et résultats



1.4.2. Principales méthodes de recherche et de dénombrement des micro-organismes dans les aliments

Le règlement (CE) n°853/2004 (Commission européenne, 2004) définit le « lait cru » comme un produit de la sécrétion de la glande mammaire d’animaux d’élevage et non chauffé à plus de 40 °C, ni soumis à un traitement d’effet équivalent. La législation requiert un taux de matières grasses supérieur ou égal à 35 g/L pour le lait commercialisé « entier » (Cuq, 2007). Le lait de vache est de très loin le plus répandu et, de par sa composition, il constitue un bon milieu de culture pour la plupart des microorganismes. Les techniques de microbiologie classique (les plus anciennes) permettent une

identification de l'espèce (Lafarge, 2013). Les applications de ces méthodes peuvent varier de détection à identification et caractérisation. La culture bactériologique des échantillons de lait est une méthode largement utilisée par de nombreux laboratoires pour l'identification bactériologique. L'identification classique passe d'abord par l'isolement des microorganismes à étudier sur des milieux gélosés ou des bouillons. Elle se révèle être une technique relativement lente, car il faut attendre un minimum de 24 à 72 heures avant d'obtenir les résultats (Hogan et al., 1999).

Les critères d'identification des microorganismes peuvent être répartis en deux groupes : les caractéristiques morphologiques, d'une part, et les caractéristiques biochimiques et physiologiques, d'autre part (Lafarge, 2006). Les caractéristiques morphologiques regroupent principalement l'aspect des colonies (taille, forme, couleur...) comme pour les *Staphylococcus aureus*, *E.coli* et les coliformes dans la présente étude. Les dilutions des échantillons de laitensemencés ont varié entre 10^1 et 10^2 en suivant les normes officielles recommandées ISO 6888-1 (1999) pour le dénombrement des *Staphylococcus aureus* et ISO 7251 (2005) pour *Escherichia coli*.

La méthode de référence pour l'analyse des *Staphylococcus aureus* dans le lait précise qu'il faut tenir compte, pour le dénombrement, des boîtes contenant au moins 15 et au plus 300 colonies à 37 °C après 24 à 48 h d'incubation. Les colonies des *Staphylococcus aureus* présentent un aspect caractéristique de colonies noires, brillantes, entourées d'un halo transparent. Les boîtes positives sont conservées pour la confirmation par le test de coagulase. Pour enrichir la culture, une colonie caractéristique de chaque boîte est prélevée avec une anse stérile. Cette colonie est repiquée dans un tube contenant le bouillon nutritif, puis incubée à 37°C pendant 24h ± 2h. Après incubation, un volume de 0,1 ml de cette culture est introduit dans des tubes Eppendorf contenant 0,3 ml de plasma de lapin, puis est incubé à 37°C pendant 4 à 6h pour la première lecture et 24h après pour une seconde lecture. On constate une coagulation du contenu c'est à dire une prise en masse du fond de tube dans les tubes positifs mais pour le tubes négatifs, le contenu reste liquide. Les dénombrements des *E. coli* sur le milieu chromogène prévoit, selon la norme, un comptage de colonies après incubation pendant 24h à 44 °C et les coliformes totaux à 37°C. Les *E. coli* forment des colonies violettes à roses et les autres coliformes forment des colonies bleues à vertes. Les caractéristiques biochimiques et physiologiques permettent de préciser l'espèce du microorganisme, alors que les caractéristiques biochimiques ne permettent généralement d'identifier que le genre. Ces tests biochimiques sont rassemblés dans des galeries miniaturisées type API qui sont sélectionnées en fonction du genre ou du groupe d'espèces à identifier (Prescott, 1995 et Lafarge, 2006). De plus, avec l'utilisation de milieu chromogène le pourcentage d'échantillons varie entre 25 et 45 % en fonction du seuil de dénombrement (Makovec et Ruegg, 2003 ; Bradley et al., 2007 ; Koivula et al., 2007). Seule la flore cultivable sur le milieu nutritif choisi est prise en compte, et non les flores non cultivables, ce qui conduit à une sous-estimation importante de la diversité microbienne. Les techniques de biologie

moléculaire ont alors commencé à être utilisées dans le cadre du diagnostic des micro-organismes afin de remédier aux imprécisions de la culture bactérienne. Ces techniques moléculaires, qui ne nécessitent aucune culture ou isolement *in vitro* des microorganismes, sont basées sur l'analyse directe de l'ADN (ou ARN) des micro-organismes. C'est ainsi que des « Polymerase Chain Reaction » (PCR) multiplexées ont été développées et mises au point (Phuektes et al., 2001). La PCR spécifique est l'héritage de la technique d'hybridation ADN/ADN. Les banques de séquences ont d'ailleurs beaucoup contribué à la promotion de cette technique. Cette approche présente l'avantage de permettre la détection d'espèces non dominantes dans un écosystème complexe car les amorces choisies ne sont plus universelles mais spécifiques de l'espèce ou du groupe d'espèces ciblées (Lafarge, 2006). Parmi ces méthodes, on peut citer :

- la TTGE ou Temporal Temperature Gradient Gel Electrophoresis (Zhu *et al.*, 2002 ; Ogier *et al.*, 2002 et 2004 ; Andrighetto *et al.*, 2004 ; Lafarge, 2006) ;
- la DGGE ou Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (Ercolini *et al.*, 2003 et 2004 ; Meroth et al., 2003 ; Ogier et al., 2004 ; Montesi et al., 2005 ; Theunissen et al., 2005);
- la SSCP ou Single Strand Conformation Polymorphism (Schwieger et Tebbe, 1998 ; Godon et al., 1997 ; Ghozzi et al., 1999 ; Duthoit et al., 2003 ; Feurer et al., 2004, Lafarge, 2006);
- PFGE ou Pulsed Field Gel Electrophoresis qui diffèrent par la méthode de séparation des fragments de PCR.
- la MLST ou Multi-Locus Sequence Typing (Lafarge, 2006) ;
- WGS ou Whole Genome Sequencing (Lopez et al., 2013).

Une nouvelle méthode de recherche de la diversité microbienne a vu le jour, la métagénomique qui a pour défi de relier les informations génétiques issues des bactéries aux organismes desquels l'ADN a été extrait (Genivaldo et al., 2016 ; Handelsman, 2004 ; Rodriguez-Valera, 2004). La métagénomique permet d'avoir des informations pertinentes sur la communauté microbienne qui vit dans le milieu et sur l'activité d'un écosystème à un moment donné. Enfin, elle permet d'étudier le fonctionnement des organismes tels qu'ils sont dans leur environnement et non pas tels qu'ils sont après quelques temps passés dans un laboratoire (Chen et al., 2005). Comme la métagénomique est à la fois une discipline très récente et générant une quantité de données sans précédent dans les sciences du vivant, seuls quelques logiciels parmi les plus connus en génomique sont utilisables en pratique. Mais étant donné que la métagénomique et la génomique ne répondent pas aux mêmes questions, un réel besoin de nouveaux logiciels se fait sentir. Ces logiciels doivent répondre aux questions et aux besoins spécifiques dictés par la métagénomique. Mais il peut aussi être important de bien identifier les questions biologiques qu'on se pose afin de limiter la génération inutile de données, dans un fragments génomique obtenus

pour obtenir de meilleurs résultats (Cowan et al., 2005). Le principe consiste à prélever un échantillon à partir d'un environnement complexe grâce à la filtration, la lyse et l'extraction d'ADN dans l'optique de la construction d'une banque. C'est une technique de séquençage par petits bouts à haut débit qui est couplé à une analyse bio-informatique permettant de comparer toutes les séquences obtenues (Siegwald, 2017).

1.5. Contexte et justification de l'étude

Le secteur de l'élevage joue un rôle crucial dans la sécurité alimentaire compte tenu de la place de l'autoconsommation dans les stratégies des producteurs avec un cheptel de 42 millions de têtes de bétail soit 40 % du cheptel de l'Afrique de l'Ouest. Durant les dernières décennies, la croissance démographique et l'urbanisation rapide ont entraîné une forte demande en produits animaux, et notamment en lait et en viande mais les données relatives à la production laitière au Niger sont relativement imprécises. Les mauvaises pratiques d'élevages au Niger ainsi que le manque d'hygiène lors de la traite favorisent malheureusement l'entretien et la persistance des bactéries responsables des mammites et des toxi-infections alimentaires d'origine animale. Au Niger, très peu d'études ont été menées sur la qualité du lait et les rares études se limitent à l'identification de bactéries liées à l'hygiène et à la qualité dans les zones urbaines et périurbaines de Niamey. Un constat général est récurrent depuis une vingtaine d'années, celui de l'appauvrissement des microflore des laits crus (Montel et al., 2003 ; Michel et al., 2005). L'impact de la microflore des laits crus sur la qualité microbiologique a été démontré dans de nombreuses études (Demarigny et al., 1997 ; Buchin et Beuvier, 2000 ; Verdier-Metz et al., 2005).

Objectifs

L'objectif principal de ce travail est de contribuer à l'amélioration de la qualité microbiologique du lait cru à travers une meilleure compréhension de la biodiversité microbienne.

Cet objectif principal se décompose en quatre objectifs spécifiques :

- Evaluer l'utilisation des antibiotiques à travers la recherche des résidus dans les échantillons de lait.
- Mettre en évidence la qualité hygiénique du lait au niveau de 3 centres de collecte (Hamdallaye, Kollo et Say) et au niveau de 3 fermes laitières (Toukounous, Kirkissoye et Niamey périphérie) dans un but d'améliorer la qualité microbiologique du lait cru destiné à la consommation humaine et de réduire son risque sur la santé humaine
- Apprécier la diversité microbienne des laits de vache issus de six sites dont 3 fermes (Toukounous, Kirkissoye et Niamey) et 3 centres de collecte (Hamdallaye, Kollo et Say).
- Comparer la biodiversité microbienne de deux centres de collecte de lait (Hamdallaye et Kollo).

Méthodologie

L'approche méthodologique adoptée dans cette étude a consisté, dans un premier temps, à effectuer une enquête auprès des éleveurs pour évaluer leur niveau de connaissance sur le bon usage des antibiotiques ainsi que le délai d'attente appliqué et ensuite à effectuer des prélèvements d'échantillons de lait pour la recherche de résidus à l'aide du Delvotest. Une autre étude a été conduite au niveau de 3 centres de collecte de lait cru et de 3 fermes laitières dans le bassin laitier de Niamey en vue d'apprécier la qualité microbiologique et l'impact sur la santé publique. La qualité microbiologique a été appréciée sur 384 échantillons provenant de 3 fermes laitières et de 3 centres de collecte via une enquête volontaire auprès des consommateurs du lait cru pour estimer les toxoinfections d'origine alimentaire collectives causées par la consommation directe du lait cru. La diversité microbienne a été étudiée selon différents niveaux de spécificité : grands groupes microbiens, espèces dominantes, sous-espèces se basant sur différentes techniques d'isolement et de caractérisation microbiennes grâce à la technique de la métagénomique. Dans une deuxième étape, il s'agit de comparer les deux grands centres de collecte de lait par l'étude des liens possibles entre la diversité microbienne et l'énumération de la flore totale.

Section expérimentale

Section expérimentale

Etude 1 :

Survey on the presence of antibiotic residues in raw milk in Niger

*Soumis et accepté pour publication dans
Veterinary World,
www.doi.org/10.14202/vetworld.2019.1970-1974.*

Amadou Morou Madougou, Caroline Douny, Nassim Moula, Marie-Louise Scippo,
Véronique Delcenserie, Georges Daube, Marichatou Hamani, Nicolas Korsak

Préambule

L'utilisation des antibiotiques constitue la pierre angulaire dans le traitement des animaux malades mais peut représenter une menace pour la sécurité sanitaire des aliments. L'étude a été réalisée pour évaluer la présence des résidus d'antibiotiques dans le lait provenant de trois centres de collecte (Hamdallaye, Kollo et Say) et trois fermes (Toukounous, Kirkissoye et Niamey périphérie) suite à l'utilisation inappropriée des antibiotiques qui peut avoir un rôle dans l'apparition et la propagation de micro-organismes résistants et constituer une grave menace pour la santé publique. L'approche méthodologique adoptée a consisté dans un premier temps à réaliser une enquête auprès des éleveurs dans le but d'évaluer leur niveau de connaissance sur l'utilisation des antibiotiques, de décrire les pratiques dans leur utilisation et d'évaluer le niveau de connaissances des éleveurs sur la notion de délai d'attente. Enfin, il s'agissait d'effectuer des prélèvements d'échantillons de lait cru avec un taux de prévalence attendue de la contamination par les microorganismes dans une population à hauteur de 25 % pour une précision désirée de 5 % pour un intervalle de confiance de 95 % et ensuite la réalisation du test qualitatif Delvotest afin de déterminer la prévalence de résidus d'antibiotiques dans la zone d'étude. Les prélèvements de lait cru collectés dans chaque ferme ou centre de collecte ont été effectués à partir d'un seau ou bol plastique dans lequel le lait avait été récupéré au moment de la traite. La zone d'étude a un faible taux de présence de résidus d'antibiotiques mais cela peut poser un problème de santé publique à long terme sur la consommation du lait contaminé par les résidus des antibiotiques. Ceci oblige la conscientisation et l'implication de tous les acteurs de la filière.

Abstract

Background and Aim: Antibiotics are widely used in animal production for treating the diseases and for preventing or increasing animal growth. The presence of antibiotic residues in milk is a public health problem. The objective of this study was to assess the use of antibiotic residues in raw milk from the dairy pool of Niamey in three farms (Toukounous, Kirkissoye, and Niamey) and three collection centers (Hamdallaye, Kollo, and Say).

Materials and Methods: A direct interview (questionnaire) was used to collect data regarding the mode of use of antibiotics, the level of knowledge of farmers according to the withdrawal period, and a cross-sectional study was conducted on 192 samples of raw milk. The Delvotest® T was used to monitor antibiotic residues in milk. The data were analyzed using SAS and R software.

Results: The most commonly used antibiotics were those from the family of tetracycline (86.7%) and from the family of beta-lactams (13.3%). Regarding the statements of farmers, the reasons why the farmers use antibiotics were the following: About 47% in case of prevention and treatment, 29% for treatment, 12% for prevention, and 12% for increase dairy production. Moreover, the farmers lacked the necessary information about withdrawal period. Screening of antibiotic residues was performed using a standardized biological test kit, the Delvotest®. In total, from 192 samples of raw milk, 19 (9.9%) were positive including ten from collection centers and nine from farms. This could lead to a risk of exposure when a consumer drinks locally produced raw milk.

Conclusion: Raw milk supplied from the area of the study has a significant level of antibiotic residues, and the breeders have a low level of knowledge about the withdrawal period.

Keywords: antibiotic residues, cow, Delvotest, Niger, raw milk.

INTRODUCTION

Milk occupies increasingly important place in the daily diet of people in the world in general and sub-Saharan Africa in particular. Raw milk is essential material of many dairy products (yogurt, Degué ...). In Niger, milk is a strategic component for nutritional and economic reasons [1]. The production results essentially from traditional breeding cows belonging to breeds like Azawak, Goudali, Bororo, Djelli and Kouri. In these farms, health treatment is performed empirically involving indiscriminate use and uncontrolled veterinary medicines including antibiotics [2].

Residues in food from animal origin can constitute a risk for the consumer by initiating the following side effects: allergic outcomes (penicillin, streptomycin), poisoning (chloramphenicol), modification of the intestinal flora (tetracycline), and selection of antibiotic-resistant bacteria [2; 3].

The uncontrolled use of anti-microbial drugs in general and antibiotics in particular in animal production can lead to the occurrence of residues in the dairy products processed from these animals especially when the withdrawal period is not respected [2; 4; 5; 6]. Besides, antibiotic residues in animal products will be the factor of environmental and water pollution.

The administration of antibiotics imposes a withdrawal period, which is the time required for the animal body to remove completely chemical residue from treatment outcome. This period is specified on the instructions for use of veterinary drugs, as long as the product is authorized in the country. During this time, any use or consumption of meat, eggs and milk is prohibited [7].

During the withdrawal period, animal slaughtering for human consumption is prohibited as well as delivering, for human consumption, products issued from these animals like eggs and milk [7].

According to the harmful effects of veterinary drugs for humans, no residue monitoring program exists at present despite the fact that the demand for raw milk is constantly increasing in Niger. Veterinary drugs are also available, easily accessible to farmers and their distribution is not controlled by the government authorities. Unfortunately, the data of antibiotics residue in milk are still non-existing in Niger and screening the residues in milk is urgently needed.

The aim of this study is to estimate the percentage of residual antimicrobial drugs in raw milk of the cow in different areas of Niger.

Specifically, it was initially highlights the percentage of knowledge of the importance of use of antibiotics in the sites of Toukounous, Hamdallaye, Niamey, Kollo, Kirkissoye and Say by survey then, to assess the prevalence of residual antimicrobial drugs in raw milk of the cow using a standardized biological test kit form, the Delvotest® T (DSM food specialities, Delft, Netherlands).

MATERIALS AND METHODS

Study area and period

The study was carried out in six sites which are three farms (Toukous, Kirkissoye and Niamey) and three collection centres (Hamdallaye, Kollo and Say) from the dairy pool of Niamey (Niger) during the rainy season from July to September 2015. The survey questionnaires were administered to a total of 15 breeders: 12 at collection centers (4 collectors by center) and 3 in the farms (one in each farm). The choice of 15 breeders was based on the presence of the collector who was present during the period of survey and the manager of the farms. Milk collection is performed under the supervision of organizations of breeders around a collection center. Each organization is represented by a collector who collects milk with motorcycle in 3-4 villages around a radius of 40 kilometers (km) to the center of Hamdallaye, 35 km for Kollo and 15 for Say. The collector is the interface between the milk collection centre and the breeders. The survey was performed at the rainy season during which few breeders continued to supply the collection centres because of the agricultural field work.

The farm managers at the 3 farms were selected because they manage the organization, health and sale of milk for the benefit of other farm members from Kirkissoye, Niamey and Toukounous. Information has been collected on the types of antibiotics used, diseases encountered, general purpose of the antibiotics use and the knowledge of the breeders about withdrawal period.

Sampling of raw milk

The study is a cross-sectional one and consisted in making samples from bulk tank milk in the three collection centres and three farms.

Random cluster sampling method was used to increase the representativeness of the study, we assumed a prior prevalence of 25% contamination of milk with antibiotics residues based on prior studies. This value was based upon a similar study conducted in Ivory Coast where Kouame [8] observed a prevalence of 24.7% of antibiotics residues in milk. The desired precision was fixed at 5% for a confidence interval of 95%.

The sample size based on prior studies [8] was calculated by the Thrusfield formula [9], which is:

$$N = p * (1-p) * Z^2 / i^2$$

Where: N is the sample size; Z is the Z value (e.g. 1.96 for 95% confidence level, confidence interval 5%); p is the percentage picking a choice, expressed as decimal; i is the confidence interval, expressed as decimal.

Total of one hundred and ninety-two (192) samples had been collected (the samples were distributed equitably among the 6 sites in order to avoid bias during statistical analyses 32 samples for each site) randomly in sterile containers and the milk samples were transferred to the laboratory at Central laboratory of livestock (LABOCEL).

Antimicrobial residues screening test

The cross-sectional study has involved screening of milk for antimicrobial residues using the standard microbiological methods called Delvotest[®] T (DSM Food specialities, Delft, Netherlands) under the article number 5500786 and 8618000 respectively kit 25 tests ZE/EF 25 and Delvotest apparatus 108-A marketed by N.V. International Medical Product S.A (Invoice of 08/07/2015). 10 ml

of bulk milk were collected randomly in sterile containers on which the name of the site and number were listed. The Delvotest[®] is based on the inhibition of microbial growth in the presence of antibiotic residues. Hundred (100) µl of milk sample is transferred to the kit containing nutrient agar embedded with *Bacillus stearothermophilus* spores and bromocresol purple indicator using a micro-pipette and incubated at 64°C and the results were recorded for 2-3 hours. The residues of microbial growth were identified in the absence of antibiotics, the microorganism uses nutrients, ferments lactose and produce lactic acid which results in a change in the colour of the bromocresol compound from purple to yellow. If the antibiotic residues exist, the microorganism cannot grow and the purple colour of the medium remains unchanged.

Statistical analysis

The statistical analyses of the data were performed using software SAS system 2001 (SAS Institute, Inc., Cary, NC) and the R software (version 3.2.5) (Ross Ihaker and Robert Gentleman, New Zealand) were used for statistical analysis. The significant level was considered at $p < 0.05$.

RESULTS

The screening test results

Table 1: Antimicrobial residue screening results

Sites	Positive samples / total (%)	Positive/total by site (%)
Centres		
Say	4/32 (12.5%)	10/96 (10.4%)
Kollo	1/32 (3.1%)	
Hamdalaye	5/32(15.6%)	
Farms		
Kirkissoye	4/32(12.5%)	9/96 (9.4%)
Niamey	5/32(15.6%)	
Toukounous	0/32(0)	
Total	19/192 (9.9%)	

A total of 192 milk samples were collected and tested for both the farms (96 samples) and collection centres (96 samples). Overall, 9.9% (19/192) of milk samples tested were contaminated with antimicrobial drug. There were no significant differences between the farms and collection centres because $P > 0.05$.

Survey about the use of antibiotics

The table 1 gives us information on the choice of antibiotics, the purpose of uses, use of milk and Knowledge of the breeders about withdrawal period.

Table 2: Results of survey as stated by breeders (n=15)

	Numbers of occurrences= n	%= n/N*100
Types of antibiotics used		
Oxytetracycline	13	86.7%
Beta lactam	2	13.3%
Diseases encountered		
Infectious and non-infectious diseases	12	84.2%
Metabolic diseases	1	5.2%
Others without diagnosis	2	10.5%
General purpose of use		
Preventive and curative	7	47%
Curative	4	29%
Preventive	2	12%
Increase dairy production	2	12%
Knowledge of the breeders about withdrawal period		
Same day of treatment	5	33.3%
Three days after treatment	1	6.7%
According to the notice of the drug	5	33.3%
One week	2	13.3%
No ideas about the withdrawal period	2	13.3%
Milk use		
Family consumption and sales	11	76.6%
Sales	2	11.7%
Milk processing	2	11.7%

The families of antibiotics used are mainly tetracyclines (oxytetracycline) (86.7%) followed by beta-lactam antibiotics (penicillin) (13.3%). They are used individually or in combination with vitamins.

The diseases which need the use of antibiotics are infectious and non-infectious diseases (84.2%), metabolic diseases (5.2%) and others (10.5%).

According to the survey, which indicates that the breeders did not respect the withdrawal period and the consumers of locally produced milk are exposed to the contamination of raw milk with unacceptable concentrations of antimicrobial residues. The highest risk of ingesting residues above the acceptable daily intake levels prescribed by the *Codex Alimentarius* Commission was deemed to be for B-lactam or penicillin antibiotics due to their low acceptable daily intake and the high frequency of usage of these antibiotics locally especially in the treatment of infection and promote growth. The milk was used for family consumption and milk sale by 76.6% of breeders and 11.7% breeders used milk respectively for sales and processing according to the survey.

DISCUSSION

This is the first time a widespread assessment of drug residues present in raw milk collected from 3 farms and 3 collection centres has been carried out in the dairy pool of Niamey by using a qualitative test. According to international standards, the presence of antibiotics in both milk and milk product is not acceptable because consumers may already have allergic reactions and some health problems [2]. Therefore, the presence of antibiotics residues in raw milk should be controlled because it can upset the process of dairy production and can permit the growth of some pathogens like *salmonella* and *staphylococcus aureus* in milk [2].

The population interviewed during the study had no device to evaluate the quality of the produced milk. They performed only a traditional physical control of the milk (tasting, visual aspect, smell, color and filtration). The surveyed breeders said that they do not have the resources necessary for quality control. But the collection centers of Say, Kollo and Hamdalaye had the device Delvotest® T available for the control of antimicrobial residues at reception.

This study has confirmed that tetracycline was the main group of antibiotics detected in milk samples. Thirteen of interviewed persons were using antibiotics like tetracycline and 2 used the beta-lactams for the treatment of diseases and this statement is confirmed by other authors [10].

In Côte d'Ivoire, Kouame [8] showed that tetracycline was generally used to treat sick cows. Furthermore, surveys by Alamedji *et al.* [2] revealed that one of the most used antibiotics in Senegal was also tetracycline and the same was reported in Nigeria [11].

According to the answers of breeders, the antibiotics were used for preventive, curative and to increase the dairy production. In Belgium, Reybroeck [10] confirms the statements that the antibiotics are used for curative and preventive in a study on the search for antibiotic residues in milk.

Tetracycline imported from foreign countries seems to be the most used antibiotic family in the West African sub-region. However, in Niger, imported veterinary drugs are dominated by antimicrobial compounds (86% of therapeutic classes) among which, 54% are trypanocides. The majority of veterinary products originate from Europe [12]. All surveyed breeders (100%) stated that they used antibiotics in their farm in case of infection [2; 7].

According to the state of the breeders, the most antibiotics found on the market are the penicillin-based drugs and oxytetracycline on the market [2; 8].

Seven out of 15 breeders ignored the importance of the withdrawal period. The majority of interviewed persons did not respect the withdrawal period owing probably to their low education [7; 13].

The produced milk was at the same time intended for family consumption, for business and for processing into dairy products (like the processing of cheese called "Tchoukou"). These results are similar to those of Vias and collaborators [1] who showed that the proportion of milk sold was 68% against 32% intended for auto-consumption in Niger.

Among 192 raw milk samples collected for antimicrobial residue research by using the Delvotest T, 19 were positive (9.9 %) with no significant difference between farms and collection centres which indicates that there is not enough control over the use of the antibiotics in Niger. The positive samples at collection centres and farms may be the results of treatment of animals, without respecting the withdrawal period. Another reason may be the addition of antibiotics as preservative by collectors when they have a long distance between the village and collection centre [14; 15]. The antimicrobial drugs are obtained without any control of authorities but in Belgium (Europe) for example, sales of veterinary products are done with an authorization to market granted by the European Commission, after opinion of the Committee for Medicinal Products for Veterinary Use (CVMP) established within the European Medicines Agency (EMA) (centralized procedure) [16].

The obtained results of the number of positive milk samples in our study are lower than those observed in Côte d'Ivoire with 24.7% positive samples [8], in Ghana with 35.5% of positive sample [14], in Mali with 16% of positive samples [17], and Benin with 83% positive samples [7] but practically similar to those observed in Mauritania with 11% positive samples [18] by using the Delvotest T.

These results showed that milk contains residues of antibiotics in Niger as well as everywhere in West Africa.

The presence of antibiotics residues could be a risk for the consumer, so that there is an urgent need for a greater level of awareness among breeders regarding withdrawal period following antimicrobial therapy. But the breeding development faces several difficulties including animal diseases that require the use of veterinary medicines which can lead to the presence of residues in food of animal origin.

Delvotest[®] T is a very useful screening test but it has the disadvantage of neither identifying the molecule, nor quantifying it and not confirms the level of antibiotics present in suspicious samples against the MRL (Maximum residue limits) fixed by the regulation [19].

. On the other hand, increasing the level of health management of animals by local veterinary doctors and developing -in-house closed rearing systems can improve milk yield and meat production amounts

then the control of veterinary drug administration rate. The public health entity for consumer protection which necessitates integration of local veterinary medical organization and human health authorities to support the cost of reducing contamination and discarding contaminated milk and meat by the veterinary medical drugs, as recent recommendation of WHO [20].

This study has exposed a potentially serious public health statement for consumers of raw milk in Niger and also a repeated exposure over long periods to antimicrobial drug residues in milk can lead to drug resistance within population [14].

We therefore recommend further surveillance of milk for detection of the presence of antibiotic residue and enforcement of the actual legislation on the use of antibiotics to ensure the safety of animal products in Niger.

CONCLUSION

In Niger, the breeding sector is a major source in terms of food security of the population and as well as a source of supply of animal protein.

But the breeding development faces several obstacles including animal diseases that require the use of antimicrobial drugs which can lead to the presence of residues in food of animal origin. The main factor considered to underlie the presence of antibiotics residues may be unrelated to the variation in the withdrawal period and the level of education.

It is in this context that we have undertaken an investigation on the presence of residues in milk. The surveys make global identities of the antibiotics used by farmers and also to appreciate the different systems in connection with the use of antibiotics.

Therefore, raw milk at the six sites in the dairy pool of Niamey contains antibiotic residues with a percentage of 9.9%. These results demonstrate the non-compliance of the withdrawal period, abusive use of antimicrobial drugs without any control of authorities and the study has also revealed the fact that breeders use Tetracyclines in 86.7% and 13.3% Beta-lactams.

There is no sufficient and necessary control over the farms and milk collection centres in determining the remaining antibiotics during delivery of milk. On the other side, poor livestock management, low supervision over the livestock and husbandries, non-compliance with sanitary conditions including the obligatory vaccination can cause the animals to get diseases, for the treatment of which the farmers have no choice other than taking antimicrobial drugs.

Training of the farmers and also preventing the delivery of contaminated milk to the collection centres which would be very effective response in reducing antimicrobial residues in raw milk. Moreover, control and detection of antibiotics residues in food and other products of animal origin can also be done to protect the health of consumers. It is recommended that the antimicrobial residue of any kind of antibiotics in Niger must be implemented with standards of the European Union in absence of internal standards.

A research must be done to clearly define the risk factor of antimicrobial drug residues in raw milk in all the dairy pool of Niger and how it can introduce the respect of withdrawal period following drug administration.

Authors Contribution

AMM: Prepared the questionnaire for data collection, sampling method, prepared the manuscript and made laboratory analysis. CD: Revised the manuscript. NM: made and approved statistical analysis. NBL: Prepared and made laboratory analysis. MLS: revised the manuscript. VD: Prepared and revised the manuscript. GD: revised the manuscript. MH: revised the manuscript. NK: Prepared and revised the manuscript.

All authors read and approved the final manuscript

Acknowledgements

This work was carried out with the financial support (Grant no. WAAPP1C NIGER/IDA/NER 4877) of West African Agriculture Productivity Program (PPAAO/WAAP) of Niger. The authors also

thank the breeders for their collaboration and Nana Barira LAMINOUE for her participation in the laboratory analysis.

Ethical Approval

There is no ethical approval

References

1. Vias Franck S.G., Bonfoh B., Diarra A., Naferi A., Faye B (2003) Les élevages laitiers bovins autour de la Communauté Urbaine de Niamey : Caractéristiques, production, commercialisation et qualité du lait, Etudes et recherches sahéliennes. N°8-9, 7p
2. Alamedji R.B, Akakpo A.J, Teko-agbo A et al. (2008) Contrôle des résidus: exemple des antibiotiques dans les aliments au Sénégal. Manuscrit conférence OIE : Législation, enregistrement et contrôle des médicaments vétérinaires en Afrique. Dakar, Sénégal, 25-27 mars 2008.-11p.
3. Pawelczak K., Makowski M., Kempny M (2002) "Sulfamide antifolates inhibiting thymidylate synthase: synthesis, enzyme inhibition and cytotoxicity". Acta Biochimica Polonica. 49, p. 407-420.
4. Bekhouche, F (2006) Bactéries lactiques du lait cru de vache et microorganismes pectinolytiques des olives noires et vertes: Isolement et identification biochimique, évaluation et optimisation de la production de polygalacturonase. *Thèse de Doctorat unique, Université de Mentouri Constantine*, p.119p.
5. Colinet, F.G., Troch T., Vanden B.S., Soyeurt H., Gengler H., Abbas O., Baeten V., Dehareng F., Sinnaeve G., Dandenne P., et Sindic Marianne(2013) Étude de la variabilité des aptitudes à la transformation laitière en Région wallonne basée sur l ' utilisation de la spectrométrie infrarouge. , pp.86–92
6. Anses (2014) Evaluation des risques d'émergence d'antibiorésistances liées aux modes d'utilisation des antibiotiques dans le domaine de la santé animale. , p.173.

7. Mensah S E P, A.B. Aboh, S. Salifou, G.A. Mensah, Pascal Sanders, et al. (2014) Risques dus aux résidus d'antibiotiques détectés dans le lait de vache produit dans le Centre Bénin. *Journal of applied biosciences*, Elewa, 2014, 80, pp.7102-7112.
8. Kouamé S.S.M. (2013) Contribution à la gestion des risques de contamination microbienne et diversité génotypique des espèces du genre *Bifidobacterium* isolées de la chaîne de production du lait local à Abidjan (Côte d'Ivoire). Thèse unique. Université nangui Abrogoua. Pages 234.
9. Thrusfield, M.V (1986) *Veterinary Epidemiology* (Londres, Butterworth Heinemann).pages 626
10. Reybroeck W, (2010). Screening for residues of antibiotics and chemotherapeutics in milk and honey. Doctorat thesis. Faculteit Diergeneeskunde Universiteit Gent. 295 p.
11. Ezenduka, EV, Oboegbulem, SI, Nwanta, JA, Onunkwo, JI (2011) Prevalence of antimicrobial residues in raw table eggs from farms and retail outlets in Enugu State, Nigeria. *Tropical Animal Health and Production* 43, 557–559
12. Soumana B A (2013) Étude de la distribution des médicaments vétérinaires et aspect réglementaire de la pharmacie vétérinaire au Niger. Thèse de doctorat en médecine vétérinaire à l'EISMV de Dakar (Sénégal). 135 pages
13. Biagre S.T,Serge S,Mahamady T,Daniel I,Gertrude B T, Hadiza B I,S Caroline B,Alfred S T, Nicolas B (2015) Détection biologique des résidus d' antibiotiques dans le lait et produits laitiers de vache consommés à . , pp.8105–8112.
14. Aning K.G,Donkor E.S,Omoro A,Nurah G.K,Osafo E.L.K,Staal S (2007) Risk of exposure to marketed milk with antimicrobial drug residues in Ghana .*The Open Food Science Journal* 1,1-5

15. Adil M.S,Hind A.E,Intisar A.M.O,(2012) Detection of antibiotic residues in milk using Delvotest kit and Disc assay methods in Khartoun State, Sudan.UofK.J.Vet Med and animal Production Vol3 N°2,2012 (3-15) p14.
16. BelVetSAC (2015) National Consumption report of Belgian veterinary surveillance of antibacterial consumption.pages 40.
17. Bonfoh B, Dem S, Keita O, Delorenzi S, Traore H, Simbe CF, Alfaroukh IO, Farah Z, Nicolet J (2003) Assessment of antibiotic residues by microbial inhibitor tests in fresh cow milk sold in Bamako (Mali). *Milchwissenschaft*, 58, (5–6): 304–307.
18. Issa, G. A (2012) Evaluation des pratiques d'utilisation des médicaments vétérinaires et détermination de la prévalence des résidus d'antibiotiques dans la viande et le lait dans le Gorgol en Mauritanie. Mémoire Master Méd. Vét, Sénégal. 31p
19. Edder P. (2002) Analyse des résidus d'antibiotiques dans les denrées alimentaires d'origine animale. [Online]-Internet access http://www.geneve.ch/consommation/docs/medicamenteux_final.pdf(consulted le 02.11.2015).
20. Organisation Mondiale de la Santé (OMS). (2014) Antimicrobial Resistance : Global Report on Surveillance ;-257p.

Section expérimentale

Etude 2 :

Qualité microbiologique du lait cru de vache de la zone péri-urbaine de Niamey (Niger)

En préparation pour publication

Amadou Morou Madougou, Issa Hamadou, Nassim Moula, Sébastien Crevecoeur, Véronique Delcenserie, Georges Daube, Marichatou Hamani, Nicolas Korsak

Préambule

En plus de la qualité chimique du lait déterminée grâce à une méthode de screening pour la détermination de résidus des antibiotiques, il convient également de vérifier la qualité microbiologique du lait cru produit au niveau de la zone d'étude. Le lait est un aliment hautement nutritif qui est également un excellent milieu pour la multiplication des bactéries. La mauvaise couverture sanitaire constitue l'une des principales contraintes à l'amélioration de la productivité laitière en Afrique particulièrement au Niger, car elle entraîne une morbidité élevée et une faible production laitière. La majorité des éleveurs traitent leurs animaux à la main, souvent en présence des veaux pour stimuler la sécrétion lactée. La traite à la main permet d'extraire facilement le lait mais implique souvent malheureusement de mauvaises règles d'hygiène, comme le lavage des mains.

La présente étude a été conduite dans cette optique au niveau de 3 centres de collecte de lait cru et de 3 fermes laitières en vue d'apprécier la qualité microbiologique du lait et l'impact sur la santé publique des consommateurs. La qualité microbiologique a été appréciée sur 384 échantillons provenant de 3 fermes laitières et de 3 centres de collecte. Une enquête volontaire a été réalisée auprès des consommateurs du lait cru pour vérifier les toxi-infections alimentaires collectives déclarées. Un taux de 25 % de toxi-infections d'origine alimentaire chez les personnes qui consomment directement le lait cru sur les 194 enquêtés a été détecté. Les résultats témoignent du non-respect des règles d'hygiène au niveau de la production du lait cru dont la consommation sans traitement thermique présente un risque sanitaire sérieux pour la population.

Abstract

Milk is a highly nutritious food that is also an excellent medium for the multiplication of spoilage microorganisms. We conducted a study in Niger on 3 raw milk collection centres (Hamdallaye, Kollo and Say) and 3 farms (Toukounous, Kirkissoye and Niamey periphery) in order to assess the microbiological quality and the impact of raw milk consumption on public health. Microbiological quality was assessed on 384 samples. The samples tested were highly contaminated at all sites level with an average of $3.8 \log \text{ cfu/ml} \pm 0.54$ for coliforms, $3.6 \log \text{ cfu/ml} \pm 0.51$ for *Escherichia coli* and $3.9 \log \text{ cfu/ml} \pm 0.48$ for coagulase positive *Staphylococcus*.

A voluntary survey of raw milk consumers was performed to find out about foodborne disease. A rate of 25% foodborne illness among people who consume raw milk directly out of 194 survey respondents was detected.

The results show that hygiene rules are not respected in the production of raw milk and raw milk directly consumed without any heat treatment before consumption. This presents a serious public health risk.

Keywords: raw milk, microbiological quality, hygiene, Niger.

Résumé

Le lait est un aliment hautement nutritif qui est également un excellent milieu pour la multiplication des bactéries. La présente étude a été conduite au Niger au niveau de 3 centres de collecte de lait cru et de 3 fermes laitières en vue d'apprécier la qualité microbiologique et l'impact sur la santé publique. La qualité microbiologique a été évaluée sur 384 échantillons provenant de 3 fermes laitières et de 3 centres de collecte.

Les échantillons analysés sont fortement contaminés à tous les niveaux des sites avec une moyenne de $3,8 \log \text{ ufc/ml} \pm 0,54$ pour les coliformes, $3,6 \log \text{ ufc /ml} \pm 0,51$ pour les *Escherichia coli* et $3,9 \log \text{ ufc/ml} \pm 0,48$ pour *Staphylococcus* à coagulase positive.

Une enquête volontaire a été réalisée auprès des consommateurs de lait cru pour vérifier les toxi-infections d'origine alimentaire collectives liées. Un taux de 25 % de toxi-infections d'origine alimentaire chez les personnes qui consomment directement le lait cru sur les 194 enquêtés a été détecté.

Les résultats témoignent du non-respect des règles d'hygiène au niveau de la production du lait cru dont la consommation sans traitement thermique présente un risque sanitaire sérieux pour la population.

Mots clés : lait cru, qualité microbiologique, Hygiène, Niger

Introduction

Le Niger est un pays sahélien à vocation essentiellement agro-pastorale avec une superficie de 1.267.000 Km² pour une population de 19.124.884 d'habitants (Institut National de la statistique du Niger 2016). L'élevage est pratiqué par près de 87 % de la population active soit en tant qu'activité principale, soit comme activité secondaire après les cultures (Rhissa 2010). Il contribue à plus de 11 % du produit intérieur brut (PIB) national et à plus de 25 % du budget des ménages et constitue une richesse indéniable dans la sous-région Ouest-africaine (SDDE 2013).

La valeur totale de ce cheptel est estimée à 3,142 milliards de FCFA (~4,78 milliards d'euros), ce qui place le Niger parmi les plus grands pays d'élevage (Niger 2013). L'élevage constitue un atout essentiel pour la lutte contre l'insécurité alimentaire, la pauvreté et représente environ 62 % des recettes d'exportation des produits du secteur rural et 21 % de l'ensemble des produits d'exportation. Le cheptel du Niger compte des races animales hautement recherchées dans la sous-région pour leurs aptitudes bouchères et laitières comme le mouton Bali Bali, la chèvre rousse de Maradi, les zébus Azawak, Goudali, Bororo, Djelli et Kouri (Rhissa 2010). Les effectifs du cheptel nigérien en fonction des espèces sont estimés à 12.060.000 de bovins, 11.497.000 d'ovins, 15.479.000 de caprins et 1.743.000 de camélidés (INS, 2016).

Au rang des produits animaux consommés figure le lait, produit à haute valeur marchande aussi bien localement qu'à l'échelle internationale. En 2010, la production laitière annuelle du Niger était estimée à 1.002 millions de litres dont 486 millions de litres de lait de bovin (Ganda et al. 2016).

Le développement de la filière locale est organisé à travers une structure de réseau de collecte de lait autour de Niamey en vue de répondre à la demande de la capitale en lait provenant de la production locale. Les centres de collecte de lait assurent la collecte, le contrôle, le stockage et un suivi de la qualité du lait au plus près des producteurs, ce qui limite les coûts de transaction, et permet de stabiliser l'approvisionnement en amont et représentent également une plateforme de services aux éleveurs (Ibrahim 2015).

En dépit de l'importance numérique du cheptel, le Niger enregistre un déficit laitier important. La production laitière nationale actuelle est loin de satisfaire toute la demande. Elle est limitée, entre autres, par les facteurs suivants : sous-alimentation du bétail ; fréquence de certaines épizooties (exemple : péripneumonie contagieuse des bovins, peste des petits ruminants, charbon, trypanosomiase...); faible productivité des races locales et mauvaise gestion de la reproduction (Marichatou and Kore 2005 ; Moussa 2014).

Vu son caractère nutritif important, le lait est aussi un excellent milieu pour la multiplication des micro-organismes (Bonfoh 2002). Il peut contenir des bactéries comme *Salmonella*, *E. coli*, *Staphylococcus aureus* et *Listeria monocytogenes* qui peuvent causer des toxi-infections d'origine alimentaire collectives (TIAC) pouvant être sévères dans certains cas (Forsbäck et al. 2011 ; Farougou et al. 2011).

Les travaux sur la qualité microbiologique du lait au Niger sont très rares. Parmi ces travaux, on distingue une première étude intitulée « *contribution à l'étude de la qualité du lait caillé du Niger* » conduite par Djibril en 1996 qui est une thèse de médecine vétérinaire, puis une thèse de PhD intitulée « *Bilan bactériologique des mammites dans les troupeaux Zébu Azawak à la station expérimentale sahélienne de Toukounous (Niger) et épidémiologie moléculaire des Staphylococcus aureus isolés entre 2009 et 2012* » conduite par Ibrahim en 2015. Ces 2 dernières études sont les seules références actuellement disponibles sur ce sujet.

Le Niger a adopté une politique de modernisation de la filière laitière à travers la Stratégie de Développement Durable de l'Elevage (SDDE 2013-2035) avec comme vision, « *Un Niger où l'élevage à l'horizon 2035 contribue significativement à la sécurité alimentaire et nutritionnelle et améliore les conditions socio-économiques des populations à travers une gestion durable de l'environnement* » dont l'un des axes est d'améliorer la santé animale et de garantir la qualité des denrées et des produits issus de l'élevage (SDDE 2013).

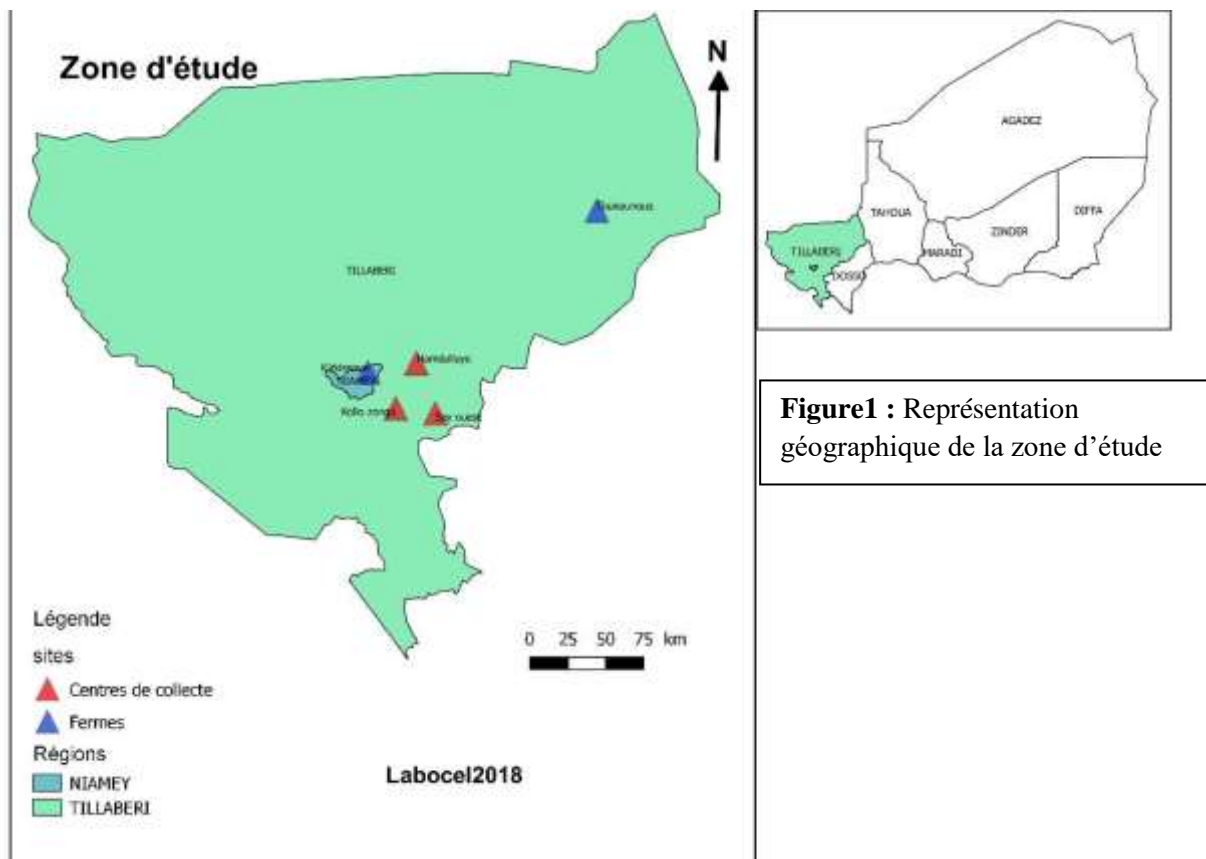
La présente étude rentre dans le cadre de cet axe et a pour objectif de mettre en évidence la qualité hygiénique du lait au niveau de 3 centres de collecte (Hamdallaye, Kollo et Say) et au niveau

de 3 fermes laitières (Toukounous, Kirkissoye et Niamey) dans un but de garantir la qualité microbiologique du lait cru destiné à la consommation humaine et de réduire son risque sur la santé humaine.

Matériel et Méthodes

Zone d'étude

L'étude s'est déroulée au Niger dans la zone péri-urbaine de Niamey au niveau de six (6) sites considérés pour l'échantillonnage : Toukounous, Kirkissoye et Niamey pour les fermes laitières et Hamdallaye, Kollo et Say pour les centres de collecte (figure 1).



Les sites ont été sélectionnés pour représenter une variation de la concentration des consommateurs, de l'accès aux marchés, de l'intensité de la production laitière et la proximité de la capitale Niamey.

Les fermes laitières

- ✓ La ferme de Kirkissoye, qui se trouve dans un quartier de la périphérie de Niamey, contient 80 bovins, dont 35 vaches laitières issues des races Azawak, Goudali, Bororo et Djelli. Le lait produit est, en partie, destiné à la vente pour la population locale, l'autre partie étant destinée à l'autoconsommation.
- ✓ La station expérimentale sahéenne de Toukounous est située à 220 km au nord-est de Niamey dans le département de Filingué (région de Tillabéry). Cette station fait partie des 6 centres de multiplication de bovins de la République du Niger. La vente du lait et celle des animaux sont les principales sources de revenus en plus de la subvention de l'Etat. Le lait est vendu soit localement auprès des coopératives féminines pour la fabrication du fromage, soit au niveau de la capitale via l'industrie laitière. Le centre assure le transport du lait jusqu'à Niamey. Au moment de l'étude, la station de Toukounous disposait de 799 bovins uniquement de race Azawak, dont 310 vaches laitières.
- ✓ La ferme laitière « Niamey périphérie » dans la communauté urbaine de Niamey est une ferme privée appartenant à un groupe d'éleveurs et située à environ 5 km de Niamey. Cette ferme comptait 105 bovins de races Azawak, Goudali et Djelli, dont 35 vaches laitières. La vente de lait se fait directement aux consommateurs et parfois aux industries laitières.

Les centres de collectes

Un modèle de collecte sous le nom de centre de collecte a été créé pour répondre aux contraintes et attentes des acteurs de la filière lait, notamment des éleveurs périurbains. Les centres de collectes agissent comme centre de prestation de services afin de répondre à l'importante demande en produits locaux à Niamey, d'offrir aux éleveurs à la fois des débouchés pour leur lait (satisfaction des exigences des industries en volume et qualité) et des services.

La traite

Les pratiques d'hygiène sont très peu développées et se limitent au nettoyage des instruments utilisés pour la traite et au nettoyage des enclos. La préparation de la mamelle et l'hygiène du trayeur

ne sont pas des pratiques courantes dans les élevages en périphérie de Niamey. La traite se fait manuellement, le veau commence la tétée pendant un laps de temps pour amorcer la descente du lait, puis le trayeur la poursuit en attachant le veau à la patte antérieure droit de la vache. La traite a lieu deux fois par jour : le matin (avant le départ au pâturage) et le soir (de retour du pâturage). La traite est arrêtée lorsque la mamelle ne libère plus du lait.

Echantillonnage

Les prélèvements ont été effectués au niveau de 6 sites dans les régions de Niamey et de Tillabery, deux régions à grande production laitière du Niger.

En absence d'étude similaire au Niger et pour une question de représentativité, on estime un taux de prévalence attendue de non-conformité microbiologique du lait cru à hauteur de 50 % par rapport aux germes recherchés.

Dans ce cadre et afin de définir au mieux le nombre d'échantillons à prélever, l'équation suivante a été utilisée (Thrusfield 1986) :

$$N = p * (1-p) * Z^2 / i^2$$

N = taille de l'échantillon, p= prévalence attendue de la maladie ou du défaut ou de la non-conformité dans une population, Z= constante =1,96 et i= précision désirée.

Au total, 384 échantillons aléatoires (soit 64 échantillons par site) de lait cru de mélange ont été prélevés de façon aseptique dans les 3 centres de collecte (Say, Kollo et Hamdallaye) et les 3 fermes d'exploitations bovines (Toukounous, Niamey et Kirkissoye) selon les méthodes standards (Icmsf 1986; IDF 1990 ; Bell et al. 1997). Le plan d'échantillonnage et l'analyse des conditions d'hygiène ont été mis en œuvre conformément aux prescriptions de l'ICMSF (1986) et du *Codex alimentarius* (FAO et OMS 2007).

Les échantillons de lait ont été acheminés au laboratoire central de l'élevage de Niamey (LABOCEL) à une température de conservation comprise entre 4 °C et 6 °C, dans une glacière contenant de la carboglace. Le temps entre le prélèvement et les premières analyses n'a pas dépassé 24 heures. Dans chaque site, nous avons prélevé des laits de mélange, c'est-à-dire les laits venant de plusieurs vaches et de plusieurs élevages et plusieurs villages ainsi que plusieurs collecteurs.

Analyses microbiologiques

Les dilutions des échantillons de laitensemencées ont varié entre 10^{-1} et 10^{-2} en suivant les normes officielles recommandées : ISO 6888-1(1999) pour le dénombrement des *Staphylococcus aureus* et ISO 7251 (2005) pour *Escherichia coli*. Le diluant utilisé était l'eau peptonée tamponnée (EPT Liofilchem réf : 611014). Les principaux milieux sélectifs utilisés pour l'isolement et le dénombrement des colonies sont décrits dans le tableau 1.

Tableau 1 Milieux sélectifs pour l'isolement des bactéries dans le lait cru de vache

Paramètre microbiologique	Milieux d'identification		INCUBATION	
	Gélose	Référence	Température (°C)	Temps (heures)
Coliformes totaux	Rapid <i>E-coli</i>	Rapid E.coli Biorad 356-4024	37	24
<i>Escherichia coli</i>	Rapid <i>E-coli</i>	Rapid <i>E.coli</i> Biorad 356-4024	44	24
<i>Staphylococcus aureus</i>	Baird Parker	BP Pronadisa (CONDA) 504142	37	24

Enquête sur le mode de consommation du lait

Un questionnaire a été élaboré pour identifier les consommateurs de lait cru à proximité des centres de collecte et des fermes et obtenir des renseignements sur le mode de consommation du lait cru.

La participation était volontaire et les informations récoltées étaient constituées des données suivantes : données personnelles, sexe, niveau d'étude, utilisation du lait, traitement thermique avant consommation ou bien transformation du lait (Hamiroune et al. 2014), mode de consommation, effets indésirables ressentis après consommation du lait.

Analyses statistiques

Afin de comparer les différents sites de prélèvements par rapport aux valeurs moyennes des paramètres microbiologiques considérées, une analyse descriptive a été réalisée.

Ainsi, pour comparer la variation du taux des paramètres microbiologiques considérés des échantillons de lait l'un à l'autre, le test non paramétrique de Kruskal Wallis a été réalisé étant donné que les résultats ne sont pas distribués normalement comme en atteste le résultat du Shapiro test (test de normalité). La transformation logarithmique a été effectuée pour les données relatives aux coliformes totaux, *E.coli*, et aux staphylocoques à coagulase positive dans le but de respecter les conditions d'application de l'analyse. Par ailleurs, le test de Wilcoxon apparié a été réalisé pour comparer les moyennes de sites de prélèvements deux à deux.

La charge bactérienne a été calculée pour chaque flore en utilisant le logiciel R (version 3.2.5) (Ross Ihaker et Robert Gentleman, New Zealand).

Une étude descriptive transversale a été réalisée pour analyser le mode de consommation du lait cru. Le test du Khi^2 a été utilisé pour l'étude de l'impact de la consommation du lait cru sur la santé des consommateurs en utilisant le logiciel SAS (2001) (Institute, Inc., Cary, NC).

Résultats

Isolement et dénombrement des paramètres de contamination dans le lait

Le tableau 2 illustre la répartition des résultats montrant la distribution des charges bactériennes dans la zone d'étude.

A Valeurs de contamination des sites par les *E. coli* (log ufc/ml)

	Site d'échantillonnage						valeur moyenne
	Hamdallaye	Kirkissoye	Kollo	Niamey	Say	Toukounous	
N / site (total = 384)	64	64	64	64	64	64	
Min	2,88	2,88	2,88	2,88	2,88	2,88	2,88
P25	3,49	2,88	3,30	2,88	2,88	2,88	2,88
Médiane	3,77	3,16	3,81	3,39	3,71	3,52	3,60
Moyenne	3,72	3,32	3,68	3,43	3,62	3,47	3,54
P75	4,08	3,78	4,00	3,87	4,09	3,86	3,96
Max	4,43	4,46	4,48	4,45	4,48	4,30	4,48

Légende : N : nombre des échantillons, Min : minimum / MA, P25 : percentile 25, Moyenne, P 75 : percentile 75, Max : maximum. Les valeurs avec des lettres différentes sont significativement différentes entre elles

B Valeurs de contamination des sites par les coliformes totaux (log ufc/ml)

	Site d'échantillonnage						valeur moyenne
	Hamdallaye	Kirkissoye	Kollo	Niamey	Say	Toukounous	
N / site (total = 384)	64	64	64	64	64	64	
Min	2,48	2,88	2,88	2,88	2,88	2,88	2,48
P25	3,28	3,36	3,81	3,10	3,52	3,78	3,48
Médiane	3,84	3,79	4,07	3,69	3,95	4,23	3,95
Moyenne	3,69	3,71	4,02	3,66	3,80	4,03	3,82
P75	4,09	4,12	4,28	4,16	4,18	4,45	4,25
Max	4,48	4,48	4,48	4,48	4,48	4,48	4,48

Légende : N : nombre des échantillons, Min : minimum / MA, P25 : percentile 25, Moyenne, P 75 : percentile 75, Max : maximum. Les valeurs avec des lettres différentes sont significativement différentes entre elles

C Valeurs de contamination des sites par *Staphylococcus* à coagulase positive (log ufc/ml)

	Site d'échantillonnage						valeur moyenne
	Hamdallaye	Kirkissoye	Kollo	Niamey	Say	Toukounous	
N / site (total = 384)	64	64	64	64	64	64	
Min	2,88	2,88	2,88	2,00	2,88	2,88	2,00
P25	3,76	3,83	3,65	3,10	3,59	3,91	3,64
Médiane	4,09	4,16	4,19	3,74	4,13	4,15	4,09
Moyenne	3,97	4,06	4,06	3,68	3,94	4,06	3,96
P75	4,41	4,40	4,48	4,16	4,33	4,34	4,41
Max	4,48	5,48	4,48	5,19	4,48	4,48	4,48

Légende : N : nombre des échantillons, Min : minimum / MA, P25 : percentile 25, Moyenne, P 75 : percentile 75, Max : maximum. Les valeurs avec des lettres différentes sont significativement différentes entre elles.

Mode de consommation du lait cru

Sur un total de 194 consommateurs de lait cru contactés, tous ont répondu favorablement à notre enquête. Une étude descriptive transversale a été réalisée pour analyser le mode de consommation du lait cru. Une analyse de proportion des données collectées a été réalisée grâce au logiciel SAS. Les résultats sont présentés dans le tableau 3.

Tableau 3 : Résultats des enquêtes sur le mode de consommation

Variable	Modalité	(Nombres)	Fréquences(%)
Enquêtes (sexes)	Male	177	91,2
	Femelle	17	8,8
Instruction	Oui	155	79,9
	Non	39	20,1
Utilisation du lait cru	Transformation	31	15,9
	Consommation	159	81,9
	Consommation Transformation	3	1,6
	Transconsvente	1	0,5
Mode de consommation	Directement	92	47,4
	Chauffer	43	22,2
	Chauffer jusqu'à ébullition et réfrigérer	12	6,2
	Mélanger avec d'autres	25	12,9
	Réfrigérer et consommer après	21	10,8
	Repas du soir	1	0,5
Intoxication alimentaire	Oui	48	24,7
	Non	146	75,3
Types de symptômes	Diarrhées	29	14,9
	Vomissement	6	3,1
	Fièvre	6	3,1
	Constipation	6	3,1
	Pas de symptômes	147	75,8

La majorité des enquêtés sont des hommes (91,2 %). Le niveau d'éducation est faible : 20,1 % des enquêtés n'ont reçu aucune éducation formelle tandis que 79,9 % ont un niveau d'éducation équivalent au moins à l'école primaire (primaire; secondaire; supérieur).

L'enquête montre que 15,9 % des consommateurs transforment le lait avant sa consommation contrairement à 81,9 % qui le consomment directement et 1,6 % qui prennent le temps de le transformer en partie en plus de le consommer directement.

La majorité des enquêtés (47,4 %) consomme le lait cru sans traitement préalable tandis que 22,2 % chauffent le lait, 6,2 % le chauffent et le réfrigèrent avant consommation, 12,9 % le mélangent avec d'autres repas et 10,3 % le réfrigèrent et le consomment ensuite sans traitement thermique.

Plus de 25 % des personnes enquêtées ont déclaré avoir souffert de symptômes similaires à des toxi-infections d'origine alimentaire (TIA) après avoir consommé le lait sans traitement thermique contre 75 % qui déclaraient n'avoir jamais contracté de maladies liées à la consommation du lait cru.

Les symptômes les plus fréquemment observés et rapportés par les consommateurs sont la diarrhée (14,9 %), vomissement (3,1 %), fièvre (3,1 %) et constipation (3,1 %).

Discussion

La qualité bactériologique a permis de prouver que les résultats microbiologiques indiquent une forte contamination en coliformes totaux, *Escherichia coli* et *Staphylococcus* à coagulase positive. Cette contamination est sans doute liée au manque d'hygiène lors de la traite, à la contamination des ustensiles utilisés pour la traite, aux conditions de transport du lait à partir des villages jusqu'aux centres de collectes et à la multitude de mélanges du lait de plusieurs éleveurs par les collecteurs. Seme et al. (2015) ont rapporté que les différents degrés de contamination des échantillons jouent sur la qualité microbiologique du lait cru surtout pour la conservation et aussi pour la transformation. La présence en grand nombre de coliformes totaux n'indique pas forcément une contamination fécale du lait, mais elle peut être considérée comme un indicateur de mauvaise pratique sanitaire, d'une part et une contamination de l'environnement, d'autre part (Farougou et al. 2011; Chye et al. 2004). L'étude sur les microorganismes indicateurs de la contamination d'origine fécale permet de juger de l'état

hygiénique du lait cru. Ils témoignent des conditions hygiéniques dégradées lors de la traite même à des niveaux très faibles. Les teneurs moyennes en coliformes totaux ($3,8 \log \text{ ufc/ml}$) observées dans cette étude sont supérieures à la limite fixée par la commission européenne au niveau du lait cru ($3 \log \text{ ufc/ml}$) selon le règlement 853/2004. Ces résultats sont supérieurs d'un facteur de $2,0 \cdot 10^4 \text{ ufc/ml}$ ($3,30 \log \text{ ufc/ml}$) aux résultats obtenus au Maroc par Labioui et al. (2009). Ils sont également supérieurs à ceux observés au Bénin par Farougou et al. en 2011 ($2,9 \log \text{ ufc/ml}$) et au Togo par Seme et al. en 2015 ($2,75 \cdot 10^3 \text{ ufc/ml}$ soit $3,44 \log \text{ ufc/ml}$). Par contre les valeurs en coliformes totaux observés dans cette étude sont inférieures à ceux observés en Malaisie ($5,2 \log \text{ ufc/ml}$ de Chye et al. (2004)). Ils sont supérieurs à ceux obtenus au Maroc par Abdelkrim et collaborateurs en 2008 ($4,3 \log \text{ ufc/ml}$), en Ethiopie par Welearegay et al. en 2012 ($4,9 \log \text{ ufc/ml}$), ceux de Taybi et al. en 2014 au Maroc ($3,02 \cdot 10^5 \text{ ufc/ml}$ ($5,48 \log \text{ ufc/ml}$)) dans différentes régions du Maroc, et enfin les résultats de cette étude sont inférieurs à ceux obtenus au Maroc et Djibouti de Hamiroune et al. en 2014 ($4,4 \log \text{ ufc/ml}$) de Mohamed et collaborateurs en 2017 ($3,9 \log \text{ ufc/ml}$).

Les valeurs intermédiaires de contamination par les coliformes totaux au niveau de notre étude pourraient se justifier par l'alimentation quasi-totale des animaux sur pâturage contrairement aux études de Taybi et al. (2014) et Hamiroune et al. (2014) où l'alimentation des vaches laitières se fait à l'étable qui peut être source de contamination.

La présence de la bactérie *E. coli*, indicateur de contamination fécale, illustre une probabilité de présence d'autres entérobactéries pathogènes dans les échantillons de lait cru (Chye et al. 2004, Farougou et al. 2011). Les valeurs de dénombrements en *E. coli* obtenues dans la présente étude ($3,5 \log \text{ ufc/ml}$) sont supérieures à celles obtenues au Bénin par Farougou et collaborateurs (2011) qui ont rapporté une valeur moyenne de $0,6 \log \text{ ufc/ml}$ et surtout à celles mentionnées en France par Raynaud et Heuchel (2005) qui ont signalé une valeur moyenne de $2,11 \log \text{ ufc/ml}$. La faible présence des *E.coli* observée par Raynaud et Heuchel en 2005 en France s'explique par le strict respect des mesures d'hygiène au moment de la traite dans les exploitations.

Les *Staphylococcus* à coagulase positive sont présents dans les échantillons de laits à une

proportion très élevée tant au niveau des fermes que des centres de collecte. La ferme de Niamey a une charge bactérienne significativement inférieure par rapport aux centres de collecte de Hamdallaye et de Kollo ainsi que par rapport à la ferme de Kirkissoye mais la charge bactérienne au niveau de la ferme de Toukounous est significativement inférieure par rapport à la ferme de Niamey. Ce constat s'explique par le fait que la ferme de Niamey est encadrée par une organisation non gouvernementale (ONG) du Niger dans le cadre de la redynamisation de la filière laitière. Cette ONG a permis l'instauration obligatoire de rejets des premiers jets de lait, le lavage des ustensiles de la traite et du transport mais nous avons constaté que le lavage des mains n'est pas systématique. IL faut reconnaître que Toukounous est une ferme de l'Etat avec les moyens de gestion adéquate. Ces *Staphylococcus* sont considérés comme agent causal des mammites cliniques et subcliniques en élevage bovins (Ibrahim, 2015).

Selon certains auteurs, les origines de contamination par les *Staphylococcus* à coagulase positive peuvent être les suivantes : environnement lors de la traite, manque d'hygiène des manipulatrices et mauvaises conditions de transport liées au non-respect de la chaîne du froid (Farougou et al. 2011, Abdelkrim et al. 2008 et Hamiroune et al. 2014).

Les moyennes des dénombrements de *Staphylococcus* à coagulase positive obtenus dans cette étude (3,9 log ufc/ml) sont plus élevées que celles obtenues par Abdelkrim et al. (2008 ; 3,6 log ufc/ml); Hamiroune et al. (2014 ; 3,3 log ufc/ml) ; Farougou et al. (2011; 1,6 log ufc/ml) et Bachtarzi et al. (2015; 3,6 log ufc/ml) mais moins élevées que celles obtenues par Bonfoh et al. (2002 ; 4,7 log ufc/ml).

Farougou et al. (2011) et Bonfoh (2002) ont rapporté une contamination très élevée des *Staphylococcus* à coagulase positive et ont émis l'hypothèse que les conditions climatiques prédisposent les animaux à une infection par ces pathogènes. Il y a des différences significatives ($p < 0,05$) entre les 6 sites de collecte des échantillons, différence qui peut être liée à l'échantillonnage, aux trayeurs ainsi qu'à l'environnement.

Un questionnaire a été soumis aux consommateurs qui ont accepté de répondre favorablement

à notre demande. Ce questionnaire contient des informations sur les consommateurs (Hamadou et al. 2007). L'étude a confirmé la grande diversité des produits laitiers. Les produits les plus consommés étaient le lait cru, le lait transformé et le lait mélangé à d'autres céréales (mil, riz et maïs) contrairement à l'enquête conduite par Hamadou et al. (2007) qui a trouvé que le lait cru était moyennement consommé en tant que tel au Burkina Faso et qu'il était transformé pour être incorporé dans d'autres produits (Dégué, boule de céréales...).

L'étude de l'impact de la consommation du lait cru sur la santé des consommateurs a montré que 25 % des enquêtés (nombre de 194) ont rapporté des symptômes de gastro-entérites à la suite de consommation de lait cru. Bien qu'une étude exhaustive sur les TIAC n'a pas été réalisée et qu'aucune statistique officielle de TIAC n'existe au Niger, ce questionnaire peut être un indicateur des symptômes ressentis par le consommateur à la suite d'ingestion de lait cru. Selon (Hamiroune et al. 2014), les TIAC à *Staphylococcus aureus* sont causées par l'ingestion d'entérotoxines et se caractérisent par une courte période d'incubation. En Europe, selon le Règlement 2073/2005, les *Staphylococcus* à coagulase positive se retrouvent à travers deux critères, soit en matière de sécurité sanitaire des aliments, soit en qualité de critère d'hygiène des procédés (sécurité pour les entérotoxines et hygiène pour la dégradation rapide du lait) et certains *E. coli* comme O157 font partie de ce groupe responsable des TIAC. Les TIAC observées peuvent être causées par les *Staphylococcus aureus*, les *E. coli* et d'autres bactéries pathogènes (Denayer et al. 2016). Le risque de maladies liées à la consommation du lait cru causées par *E. coli* ne doit pas être ignorée surtout par la plus pathogénique O157 (Giacommetti et al. 2012).

E. coli peut provenir des aliments ou vient directement d'autres individus proches de l'enfant surtout que l'intestin est envahi dans les 40 heures après la naissance. Les souches résidentes sont excrétées sur de longues périodes (des semaines voire des mois), et plus rapidement après une infection entérique ou une chimiothérapie antimicrobienne (Moullec, 2002). Les *E. coli* pathogènes sont responsables de la diarrhée, la gastrite aiguë ou la colite de l'homme (Brisabois et al. 2000) Il y a des critères de différenciation basés sur leur sérotype, leur virulence. Ce qui a amené à les classer en quatre groupes. On distingue les *E. coli* entérotoxigènes (EPEC), les *E. coli* entérotoxino-gènes (ETEC), les *E. coli* entéroinvasifs (EIEC) et les *E. coli* entérohémorragiques (EHEC) (Brisabois et al. 2000 ; Moullec, 2002).

Les bovins constituent l'un des principaux réservoirs naturels des *E. coli* mais la majorité des toxi-infections alimentaires collectives provoquées par cette bactéries sont très souvent associées à la consommation de viande hachées de bœuf insuffisamment cuite et rarement par le lait et produits laitiers (Raynaud et heuchel 2005). L'OMS a déclaré que l'origine des épidémies d'*E.coli* est la consommation de la viande hachée crue ou mal cuite et la contamination fécale des légumes (OMS, 2018)

L'hygiène de la collecte du lait est un facteur très important sur la présence de bactéries pathogènes parce que la collecte de lait est pratiquée aussi bien par les producteurs que par les non producteurs, autour de Niamey. Les quantités de lait collectées varient en fonction du profil du collecteur. Ceux qui livrent aux centres de collecte collectent entre 30 à 100 litres par jour, surtout le matin, en fonction de leurs moyens de transport, alors que les collecteurs spécialisés dans la livraison à domicile collectent en moyenne entre 4 à 12 litres par jour. La collecte se fait au moyen de bidons de capacités variables parfois dans des conditions précaires qui accélèrent la dégradation de la qualité du lait et augmentent par conséquent le risque de refus par les centres de collectes surtout en période de forte chaleur. Le manque d'hygiène et de l'environnement sont les principales causes des TIAC mais la contribution de la consommation du lait cru n'est pas prise en compte dans les maladies diarrhéiques (Bonfoh et al.2010 et 2003).

Le non-respect des bonnes pratiques d'hygiène, à savoir, le manque de lavage des mains et des trayons avant la traite, sont les causes de cette contamination massive. Le lait est un aliment de grande valeur nutritive, et selon les enquêtés, sa consommation ne doit pas rendre malade, à moins d'être consommé en excès et cette affirmation a été corroborée par Fokou et al. (2010) lors d'une enquête menée au Mali sur la qualité du lait local.

La mise en œuvre de bonnes pratiques d'hygiène dans les fermes et au niveau des centres de collectes de lait est susceptible de réduire la contamination du lait cru tandis que la sensibilisation sur l'utilisation de la chaîne du froid est également important pour empêcher ou ralentir la croissance des bactéries. Cependant, ces pratiques seules ne permettent pas d'éliminer totalement ces risques. Faire bouillir le lait cru avant de le consommer constitue la méthode la plus efficace pour éliminer un grand nombre des bactéries responsables de TIAC.

Conclusion

La charge bactérienne importante observée au niveau des centres de collectes et des fermes résulte de mauvaises conditions d'hygiène lors de la traite, du transport et des ustensiles utilisés. La présence des germes tels que *Staphylococcus* à coagulase positive et *E. coli* peuvent devenir un problème de santé publique si des mesures ne sont pas prises pour amoindrir les contaminations. Eu égard à ces résultats, nous pouvons dire que la qualité du lait cru peut être améliorée grâce à l'utilisation du système HACCP depuis le début de la chaîne de la production jusqu'à la vente.

Remerciements

Les auteurs de cet article tiennent à remercier le Programme de Productivité Agricole en Afrique de l'Ouest PPAAO-Niger pour son soutien financier. Les auteurs tiennent à remercier Dr Moumouni Harouna pour la réalisation de la carte et les éleveurs qui ont contribué à la réalisation de cette étude.

Références

- Abdelkrim, Afif, Faid Mohamed, and Najimi Mahamed. 2008. "Qualité Microbiologique Du Lait Cru Produit Dans La Région de Tadla Au Maroc." *Reviews in Biology and Biotechnology* 7(1): 2–7.
- Abdullatif F.Mohamed,Somda Mk,Fourreh AE,Okieh AA,Said CN,Mérito A and Yagi S.,2017.Evaluation of Microbiological quality of raw milk from farms and dairy producers in six districts of Djibouti.*J.Food Microbiol.Saf. Hyg.*2017
- Bachtarzi, Nadia, Leila Amourache, and Gamra Dehkal. 2015. "Qualité Du Lait Cru Destiné à La Fabrication d ' Un Fromage à pâte Molle Type Camembert Dans Une Laiterie de Constantine (Est Algérien)." *International Journal of Innovation and Scientific Research* 17(1): 34–42.
- Bell C.,Greenwood M., Hooker J.,Rebecca M.,1997.Development and use of microbiological criteria

for food. *Food Science and Technology today*, 11, 137-176.

Bonfoh, Bassirou. 2002. "Hygiène et Qualité Du Lait et Des Produits Laitiers Au Mali : Implication En Production Laitière et Santé Publique." *Lait sain pour le sahel, Bamako, rapport d'étude* (January): 25-35.
http://hubrural.org/IMG/pdf/laitsainsahel_rapport_seminaire_2002.pdf (consulté le 20 Août 2015)

Bonfoh B., fane A., dem S., Traor E H., Sembé C.F., Alfaroukh I.O., Nicolet J., rehberger R., Farah Z., Zinsstag J., 2003. Caractéristiques physico-chimiques et biologiques du lait et des produits laitiers vendus à Bamako. *Revue Etud. Rech. sahel.*, 8-9 : 8-12.

Brisabios A., Lafarge V., Brouillaud A., De buyser M.L., Collette C., Garin-Bastuji B., et Thorel M.F. 2000. Les germes pathogènes dans le lait et produits laitiers : situation en France et en Europe. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, 16(1), 452-471.

Chye, Fook Yee, Aminah Abdullah, and Mohd Khan Ayob. 2004. "Bacteriological Quality and Safety of Raw Milk in Malaysia." *Food Microbiology* 21(5): 535-41.

Commission Européenne, 2005. Règlement N° 2073 du 15 Novembre 2005 concernant les critères microbiologiques applicables aux denrées alimentaires. *J. Off. Comm. Eur.*, 2005. L338/1, 26p

Denayer S., Delbrassine L., Verhaeger B., et Botteldoorn N. 2016. Intoxications alimentaires en Belgique en 2016. *Rapport annuel. AFSCA*, pages 37

Djibril, Hamza Alio. 1996. "Contribution à l'étude de La Qualité Du Lait Caillé Du Niger." Thèse : Med Vet, Université Cheick Anta Diop de Dakar.

Farougou, Souaibou, Sessou Philippe, and Kadoeito Cyrille Boko. 2011. Qualité microbiologique du lait cru de vache élevée en milieu extensif au Bénin. *Research Journal of Microbiology* 7(7) : 337-343.

- Fokou, G, B V Koné, and B Bonfoh. 2010. Mon Lait Est Pur et Ne Peut Me Rendre Malade': Motivations Des Acteurs Du Secteur Informel et Qualité Du Lait Local Au Mali. *Revue Africaine de Santé et de Productions Animales (RASPA)* 8: 75–86.
- Forsbäck L, Lindmark-Mansson H, Svennersten Sjaunja K, Bach Larsen L, Andrén A.. 2011. "Effect of Storage and Separation of Milk at Udder Quarter Level on Milk Composition, Proteolysis, and Coagulation Properties in Relation to Somatic Cell Count." *Journal of Dairy Science* 94(11): 5341–49.
- Ganda O. 2016. Experience des centres de collecte paysans multiservices au Niger. Document de synthèse issu des nombreuses études réalisées dans le cadre du projet Nariindu, par l'IRAA et ses partenaires Karkara VSF-B, AREN, RBM. pge 24.
- F. Giacometti, A. Serraino, P. Bonilauri, F. Ostanello, P. Daminelli, G. Finazzi, M. N. Losio, G. Marchetti, G. Liuzzo, R. G. Zanoni, et R. Rosmini. 2012. Quantitative risk assessment of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 and *Campylobacter jejuni* related to consumption of raw milk in a province in northern Italy. *Journal of Food Protection*, Vol. 75, No. 11, 2012, Pages 2031–2038
- Hamadou S, E. Palé, D. Hébié. 2007. Determinants de la consommation des produits laitiers à Bobo Dioulasso au Burkina Faso : Facteurs sociaux et sensibilité au prix. *Revue Elev. Méd. Vét. Pays trop.* 60(1-4) :51-58.
- Hamiroune, Mourad, A. Berber, and S. Boubekour. 2014. Qualité bactériologique du lait cru de vaches locales et améliorées vendu dans les régions de Jijel et de Blida (Algérie) et impact sur la santé publique. *Annales de Médecine Vétérinaire* 158(2): 137–44.
- Ibrahim, Issa. 2015. Bilan bactériologique des mammites dans les troupeaux zébu azawak à la station expérimentale sahélienne de Toukounous (Niger) et épidémiologie moléculaire des *Staphylococcus Aureus* Isolés Entre 2009 et 2012. Thèse de Docteur en Science Vétérinaire de la

FMV de l'université de Liège p 160.

ICMSF. 1986. Sampling for Microbiological Analysis: Principles and Specific Applications. *Blackwell Scientific Publication 2*: 127–278. <http://seafood.oregonstate.edu/.pdf Links/Sampling-for-Microbiological-Analysis-Principles-and-Specific-Applications-ICMSF.pdf>.

IDF,1990. Handbook on milk collection in warm developing countries.IDF special issue N°9002,Brussels (Belgium),pp.1-148.

Institut National de la statistique-Niger. 2016. Le Niger En Chiffres 2016. : 1–84. <http://www.ins.ne>.

Labioui H., Elmoualdi L., Benzakour A., EL Yachioui M., Berny E. H., Ouhssine M., 2009. Etude physicochimique et microbiologique de laits crus. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, 148, 7-16pp.

Marichatou, Hamani, and Harouna Kore. 2005. “Synthèse Bibliographique Sur Les Filières Laitières Au Niger.” *réseau de Recherche et d'Echanges sur les Politiques Laitières* 04: 40.

Moullec M. 2002.Les sources de contamination microbiologique du lait de bovins de la production à la consommation dans les pays du Sud. Mémoire DESS. Université Montpellier 2

Niger, Ministère de l'Élevage. 2013. Stratégie Développement Durable de l'Élevage Cons Cab. : 83 p.

OMS, FAO, 2007. Lait et produits laitiers, 1ère édition. Codex alimentarius, Rome, 258 p.

OMS. 2018. *Escherichia coli (E. coli)*. Who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/E.coli. consulté le 07-02-2020.

Organisation Internationale de Normalisation, 1999. Microbiologie aliments-Méthode horizontale pour le dénombrement des *Staphylococcus* à coagulase positive (*Staphylococcus aureus* et autres espèces).Partie 1 : Technique utilisant le milieu gélosé de Baird-Parker.11 p.

Organisation Internationale de Normalisation, 2005. Microbiologies des aliments-Méthode horizontale pour la recherche et le dénombrement d'*Escherichia coli* présumés et coliformes 13 p

- Raynaud S. et Heuchel V., 2005. Surveillance et maîtrise de la prévalence du portage des *Escherichia coli* producteurs de Shiga-toxines (STEC) dans les élevages bovins. Recherche des moyens de prévention de la contamination du lait cru à la production. Compte rendu du Ministère de l'Éducation nationale, de l'Enseignement Supérieur et de la recherche. pages 124.
- Rhissa, Zakary. 2010. "Revue du secteur de l'élevage au Niger." *Ministère de l'Élevage, des Pêches et des Industries Animales*: 1–115.
- SAS Institute. 2001. Statistical System Institute, User's Guide: Statistics. SAS Institute, Inc., Cary, NC.
- Seme k., Pitala W., et Osseyi G. E., 2015. Qualité Nutritionnelle et Hygiénique de laits crus de vaches allaitantes dans la région maritime au Sud-Togo. *European Scientific Journal* December 2015. édition vol 11, N°36 ISSN :1857-7881
- Siuosaran, Véronique. 2003. Hygiène du lait cru en zone urbaine et périurbaine de Niamey, Niger. Diplôme d'études supérieures spécialisées productions animales en régions chaudes (2002-2003). Rapport de stage pages 66.
- Taybi N.O., Arfaoui A., Fadhi M., 2014. Evaluation de la qualité microbiologique du lait cru dans la région du Gharb, Maroc. *International Journal of Innovation and Scientific Research* ISSN 2351-8014 Vol. 9 No. 2 Sep. 2014, pp. 487-493
- Thrusfield, M., 1986. *Veterinary Epidemiology*, 3rd edition Cambridges, Black Well Science Limited pages 626.
- Welearegay, Haile, Zelalem Yilma, and Yosef Tekle-Giorgis. 2012. "Hygienic Practices and Microbiological Quality of Raw Milk Produced under Different Farm Size in Hawassa, Southern Ethiopia." *Agricultural Research and Reviews* 1(4): 132–42.

———— Section expérimentale

Etude 3 :

MICROBIAL BIODIVERSITY ANALYSIS IN NIGER RAW MILK THROUGH METAGENETICS

————

<p><i>Soumis pour publication dans la revue Food Protection en révision</i></p>

Amadou Morou Madougou, Bernard Taminiau, Véronique Delcenserie, Georges Daube,
Marichatou Hamani, Nicolas Korsak

Preamble

Nous avons étudié dans l'étude 1 et 2, la qualité microbiologique et chimique du lait dans la zone péri-urbaine et urbaine du bassin laitier de Niamey. L'élevage centré sur la ville est confronté aux besoins importants en matière de sécurité alimentaire (sous-entendu sécurité des approvisionnements). Il y a une forte demande en lait et en produits laitiers, mais cette demande est confrontée à un problème de gestion des ressources naturelles. La production laitière est saisonnière : elle est abondante en saison des pluies et en début de saison froide du fait du nombre élevé de mises bas, de la disponibilité de l'eau et des pâturages de bonne qualité.

L'étude a été conduite au Niger dans le bassin laitier de la ville de Niamey pour récolter des informations pertinentes sur la communauté microbienne retrouvée dans le lait cru de vache. A cette fin, une analyse métagénomique utilisant la technologie Illumina a été utilisée sur 36 échantillons de mélange de lait cru prélevés au niveau de 6 sites de production et de collecte de lait cru à savoir : Toukounous, Hamdallaye, Say, Kollo, Kirkissoye, Niamey. L'analyse métagénomique des données de séquençage de la région V1-V3 de l'ADN ribosomal 16S a permis d'obtenir l'identité et l'abondance relative des populations dominantes présentes dans le lait cru et concernant la qualité hygiénique du lait cru. En conclusion, ces résultats démontrent que l'analyse métagénomique et microbiologique des communautés microbiennes du lait cru en fonction des pratiques d'élevage, de traite, de transport et des conditions environnementales constitue un outil intéressant pour l'amélioration de l'hygiène et de la conservation du lait en plus de la gestion de la sécurité sanitaire.

ABSTRACT

A study of microbial ecosystems in raw milk produced in Niger was conducted through metagenetic analysis using Illumina technology. Thirty-six raw milk bulk samples were collected from 3 farms and 3 raw milk collection centres in the Tillabéri and Niamey areas of Niger, specifically Hamdallaye, Say, Kollo (collection centres), Toukounous, Kirkissoye, and Niamey (farms).

Metagenetic analysis of sequencing data of the V1-V3 region of the 16S rRNA gene resulted in the identification of dominant bacterial populations and their relative abundance. Bacterial phyla in descending order of abundance were as follows: *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Acinetobacter*, *Enhydrobacter*, and *Streptococcus*. Each of those contained prevalent genera (>5%), and the most abundant genus observed was *Acinetobacter*. The mean results of bacteriological analysis of the 36 samples were as follows: total coliforms 1.6×10^4 CFU (Colony Forming Units) / ml, *Escherichia coli* 5.1×10^3 CFU / ml and *Staphylococcus aureus* 1.3×10^4 CFU / ml.

The conducted microbial community analyses of raw milk were aimed at improving milk hygiene and conservation, and to contribute to food safety through improving knowledge of the microbial communities during animal husbandry, transport, and environmental practices. As stated, the use of targeted metagenetic analyses revealed a high abundance of various members of the bacterial community, the most important of which in regards of conventional microbiology were the *Proteobacteria* and *Firmicutes*.

Key words: Milk, Bacterial populations, cows, metagenetics, Niger

INTRODUCTION

Niger is a landlocked country with an area of 1,267,000 km², whose southernmost border is more than 600 km from the sea (Gulf of Guinea), and has a population of 19,124,884 (INS, 2016). Niger has a Sahelian climate that is characterized by a short rainy season from three to four months (from May-June to September), and a dry season from eight to nine months (from September-October to May-June). The distribution of rainfall, which is very important for most rural activities, is irregular in space and time, which tends to increase its aridity.

In Niger, a predominantly agro-pastoral country, animal breeding is performed by nearly 87% of the active population, either as a main or secondary activity after agriculture (Rhissa, 2010). Animal breeding is a determining factor in the context of food security and poverty reduction. On average, it contributes to household income to a level of 15% and to meeting food security requirements to a level of 25% (SDR, 2006). Niger's main economic activities are subsistence agriculture, livestock farming, and uranium mining (Rhissa, 2010). In Niger, the primary animal species supplying milk are cattle, goats, camelids, and sheep. The main cattle breeds involved in milk production come from several local breeds of *Bos taurus* (Kouri) and *Bos indicus* (Azawak, Bororo, Djelli, Goudali) (Marichatou et al, 2005). There are three major national dairy sectors, namely peri-urban, rural, and ranching (Marichatou et al, 2005, Gagara et al., 2017). Raw milk is a highly nutritious food that contains proteins, fats, carbohydrates, vitamins, minerals, essential amino acids, has a near neutral pH, and high water activity.

Milk is a perishable product and an ideal medium for the growth of a wide variety of bacteria. Microorganisms may enter milk from a variety of sources and can be beneficial or harmful (Quigley et al., 2013). Despite the outstanding nutritional quality and health benefits of milk, it serves also as an excellent vehicle for transmission of milk borne pathogens that may cause serious health risk to consumers (Quigley et al., 2013; Li et al., 2018). Raw milk is known to usually harbour complex microbial communities containing diverse microorganisms (Li et al., 2018). The development of the dairy sector requires a real consideration of the control of health risks to ensure the health of the consumer, and the quality and hygiene of the products. Poor hygiene control is the main source of contamination since several pathogens can be transmitted by raw milk (Siousarran, 2003; Farougou et al., 2011). Studies performed on selected farms in Africa (Benin, Djibouti, Ivory Coast, and Mali) show that raw milk may be contaminated by a wide range of bacteria, including *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus* spp., *Brucella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., and *Corynebacterium* spp., as well as various yeasts and moulds (Farougou et al., 2011, Mohamed et al., 2017, Kouamé Sina, 2010, Bonfoh et al., 2002). Further descriptions of microbial composition and distribution would provide necessary information for risk assessment and quality control of raw milk.

The use of high-throughput sequencing technologies has allowed the analysis of very complex environmental samples through 16S rRNA gene amplification or whole metagenome shotgun (WMS) sequencing. Such techniques can retrieve the genomic information from all microorganisms present in a sample (Escabor-Zepeda et al., 2018). High-throughput sequencing has been developed for the analysis of microbial ecology and has provided detailed insights into a variety of raw milks and dairy products (Li et al., 2018). The V1–V3 region of the 16S rRNA gene is a valuable region to investigate because it provides a useful level of taxonomic resolution. Using Illumina MiSeq data for experiments targeting the 16S rRNA gene has emerged as a powerful tool for exploring the bacterial composition of various ecosystems (Korsak et al., 2016; Esposito and Kirschberg, 2014). To date, very little work has been done on the microbiological quality of raw milk in Niger. Many developing countries, including Niger, use physical and chemical tests such as milk density and chemical composition to evaluate milk quality, while studies including hygienic and/or microbiological criteria at the farm level are scant (Mohamed et al., 2017).

This study proposes to highlight microorganisms such as the coliforms, *Escherichia coli* and *Staphylococcus*, with positive coagulase present in raw milk. We also compare the microbiological analyses within the six sites surveyed using high-throughput sequencing technology to get a better understanding of their bacterial compositions at a higher resolution. In future, this work will help to improve the safety and quality of raw milk and clarify the microfloral distribution of various dietary ecosystems.

MATERIAL AND METHODS

Study area

The study was carried out in the dairy pool of Niamey, which is considered the main dairy region of Niger (Figure 1). Six (6) sites were chosen for sampling: 3 collection centers (Hamdallaye, Kollo, Say) and 3 farms (Toukounous, Kirkissoye, and Niamey). The sites were selected to represent a variation in intensity of milk production, consumer concentration, and market access. These are cattle farms and collection centres whose main activity is the sale of milk. The local breeds are mainly represented in this area and fed on pasture with wheat bran, millet, and maize supplements.

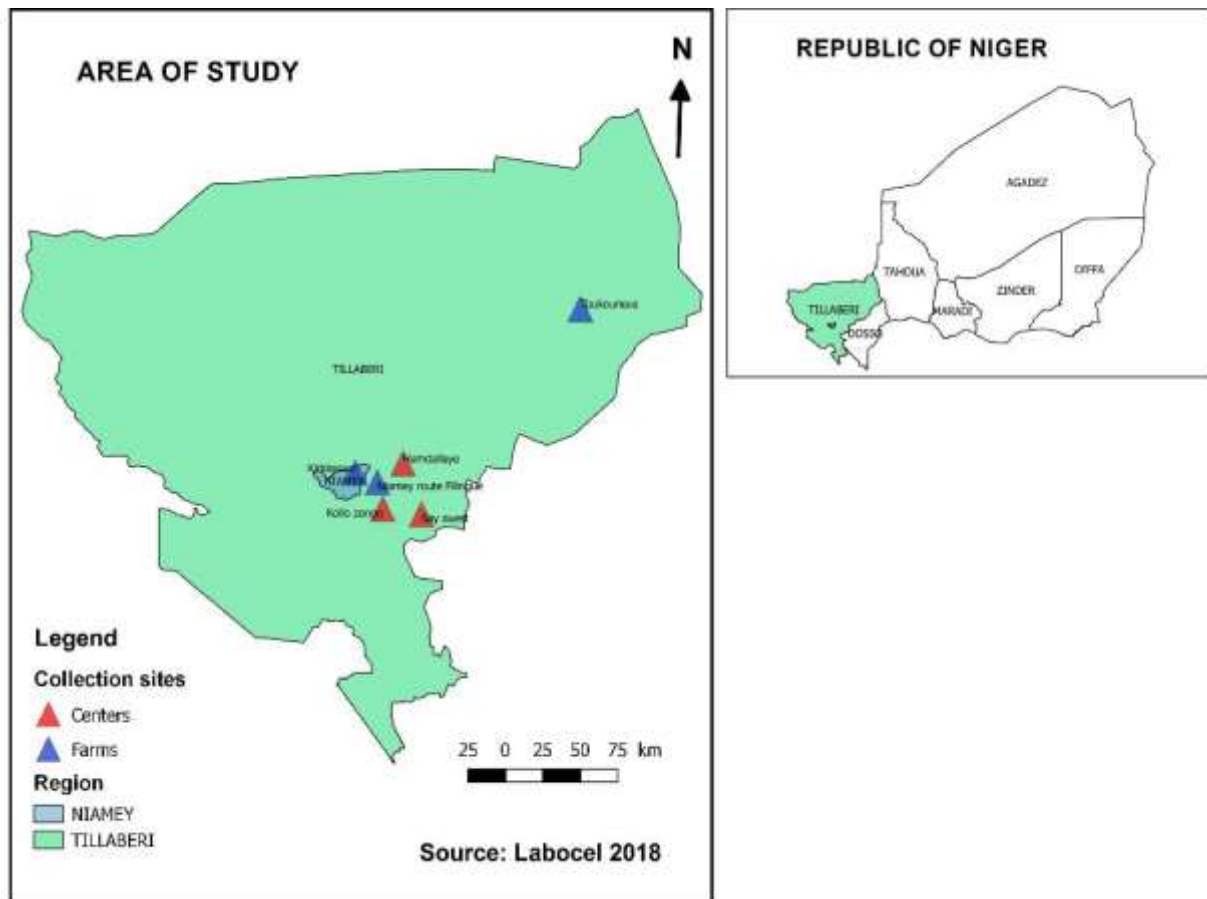


Figure 1: Geographical representation of the regions of Niger with selected areas of study

Sampling

Thirty-six (36) random samples of 150 ml of raw mix milk of the cow from the local breeds (6 raw bulk milk samples from each site and taken on the same day) were taken aseptically from the 3 collection centres and the 3 cattle farms according to standard methods (ICMSF, 1986; IDF, 1990; Bell et al., 1997). The sampling plan and the analysis of the hygienic conditions were implemented in accordance with the requirements of ICMSF (1986) and the Codex Alimentarius (FAO and WHO, 2007). The milk samples were sent to the central veterinary laboratory of Niamey (LABOCEL) at a storage temperature between 4°C and 6°C, in a cooler containing dry ice. The time between the sampling and the first analyses did not exceed 24 hours.

Microbiological analysis

The counting of *Staphylococcus aureus* was made using the ISO method 6888-2:1999 (International Organization for Standardization, 1999). Baird Parker medium with egg yolk was used,

and plates were incubated at 37°C for 24 to 48 hours. The isolates were picked and submitted to the coagulase test. The counts for *Escherichia coli* and other coliforms were obtained using the procedures specified by ISO16649-2:2005 (International Organization for Standardization, 2005). In accordance with other studies, when no colony was observed in the sample, the value of half the detection limit ($2.88 \log < \text{CFU/ml}$) was assigned (Ghafir and Daube, 2008; Hutchison et al., 2005)

16S rDNA amplicon sequencing

Total DNA extraction and amplicon sequencing

Total DNA was isolated from each primary suspension in Niger using the DNeasy Blood and Tissue DNA extraction kit (Qiagen Benelux B.V., Venlo, Netherlands) following the manufacturer's instructions. The DNA was eluted in DNase / RNase free water; its concentration and purity were evaluated by optical density using a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer. The DNA samples were stored at -20°C and kept under the same conditions until they were used for analysis.

PCR-amplification of the V1–V3 region of the 16S rDNA and library preparation were performed on 36 samples of raw milk with the following primers (with Illumina overhang adapters), forward primer (5'-GAGAGTTTGATYMTGGCTCAG-3') and the reverse primer (5'-ACCGCGGCTGCTGGCAC-3'), and were amplified and purified as previously described (Ngo et al., 2018). Each PCR product was purified using an Agencourt AMPure XP bead kit (Beckman Coulter; Pasadena, CA, USA) and submitted to a second PCR round for indexing, using the Nextera XT index primers 1 and 2. After purification, PCR products were quantified using the Quant-IT PicoGreen kit (ThermoFisher Scientific; Waltham, MA, USA) and diluted to 10 ng/µL. A final quantification, by quantitative (q) PCR, of each sample in the library was performed using the KAPA SYBR_FAST qPCR Kit (KapaBiosystems; Wilmington, MA, USA) before normalization, pooling, and sequencing on a MiSeq sequencer using V3 reagents (Illumina; San Diego, CA, USA). Positive controls using DNA from 20 defined bacterial species and a negative control (from the PCR step) were included in the sequencing run. (Ngo et al., 2018; Ceugniz et al., 2016).

Bioinformatics analysis

Sequence read processing was performed as described previously using the MOTHUR software package v1.35 (<https://www.mothur.org>) for alignment and clustering, and the UCHIME algorithm for chimera detection (Ngo et al., 2018; Rodriguez et al., 2015; Edgar et al., 2011). A clustering distance of 0.03 was used for OTU generation. 16S reference alignment and taxonomical assignment were based upon the SILVA database (v1.28) (<https://www.arb-silva.de>) of full-length 16S rDNA sequences (Ngo et al., 2018; Quast et al., 2012). The raw data were separated by barcode using

the MiSeq system program, and each sample was assigned into paired FASTQ files. The paired FASTQ files were assembled using Mothur (Schloss et al., 2011) (version 1.37.0) with the command “make.contigs”. After removing sequences with ambiguous bases and shorter sequences (<500 bp), sequences were also excluded if they were identified as chimeric sequences or contaminants.

Starting from 1,372,797 raw reads, we obtained 1,108,723 reads post-cleaning (length and sequence quality) using MOTHUR software package v1.35, and the VSEARCH algorithm for alignment, respectively. We retained 5,000 reads per sample as a subsampling process which was further screened for chimeric contaminants. Finally, 126,169 reads (median: 3,823) per sample were used for OTU clustering and taxonomic assignment. Good’s coverage estimator was used as a measure of sampling effort for each sample, with a mean value of 81%. Negative controls, as a measure of determining erroneous results due to contamination, were not sequenced as there was no detectable amplification product in the samples. Suspected contaminants found in the controls (such as chloroplasts) were removed by filtering them from the 3412 OTU (Ngo et al., 2018, Cock et al., 2010). Subsample datasets were obtained and used to evaluate alpha diversity (richness estimation – Chao1 estimator, microbial biodiversity– reciprocal Simpson index, and the population evenness was derived from Simpson index) using MOTHUR (Schloss et al., 2011).

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using R software (version 3.2.5) (R Development Core Team, 2008), which was used to determine any statistically significant differences between the sites. Any statistical difference in bacterial population between sites of samples collection was assessed with the Kruskal–Wallis test corrected or not with the Storey false discovery rate, and followed by the Tukey–Kramer post hoc test, using STAMP software. Statistical analysis of metagenetic samples was conducted using PRISM 7 (Graphpad Software; San Diego, CA, USA). The differences were considered significant for a P-value < 0.05. All the BioSample raw reads have been deposited at the National Center for Biotechnology Information (NCBI) and are available under the BioProject ID PRJNA507937.

RESULTS

Isolation, counting and identification of the desired germs in milk

Table 1: Mean values of bacteria isolated and enumerated from the sites (CFU mL⁻¹)

Sites	Means (CFU mL ⁻¹)	N° of samples	Coliforms	<i>E.coli</i>	<i>Staphylococcus</i> (coagulase positive)
Collection centres	Hamdallaye	6	5.2x10 ⁴	7.3x10 ³	1.1x10 ⁴
	Kollo	6	1.4x10 ⁴	4.4x10 ³	1.7x10 ⁴
	Say	6	1.1x10 ⁴	5.9x10 ³	1.5x10 ⁴
	Kirkissoye	6	9.4x10 ³	4.6x10 ³	2.3x10 ⁴
Farms	Niamey	6	6.2x10 ³	3.9x10 ³	1.1x10 ⁴
	Toukounous	6	5.6x10 ³	4.7x10 ³	3.6x10 ³
Total	Mean value	36	1.6x10 ⁴	5.1x10 ³	1.3x10 ⁴

Metagenetic analysis results

Next-generation sequencing allowed the identification of bacterial populations from the phylum to the species level. Alpha diversity, bacterial richness, and evenness were computed for each sample (figure 2).

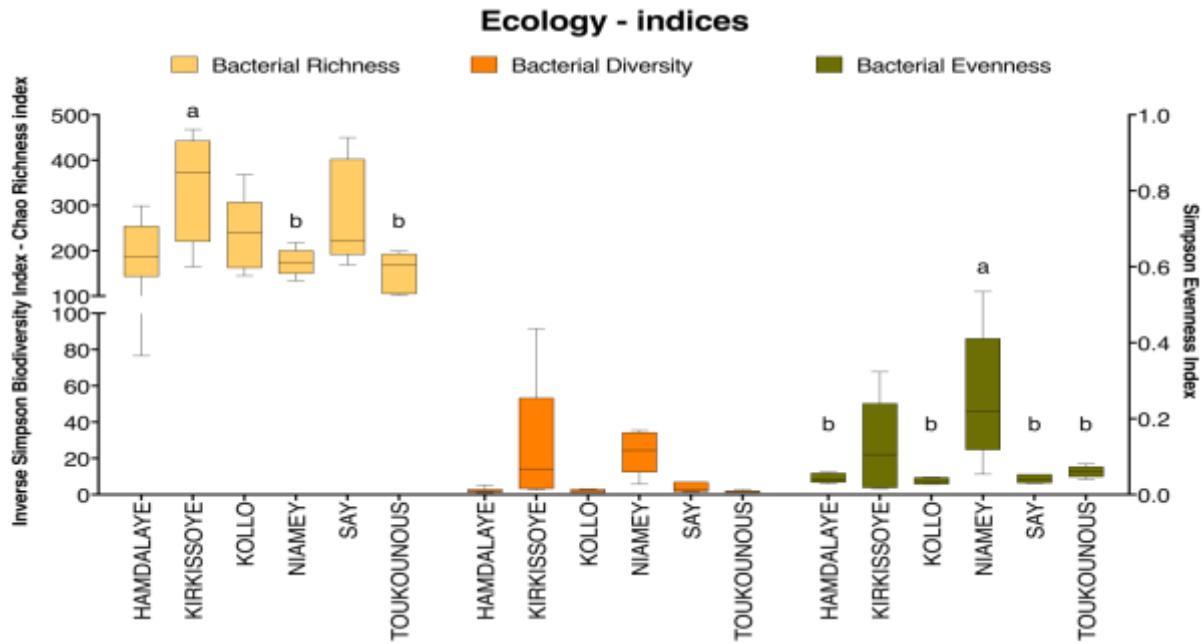


Figure 2: Bacterial alpha-diversity (non parametric Shannon Biodiversity index), bacterial richness (Chao1 Richness Index), and bacterial evenness (deduced from Shannon Index). Diversity indexes are expressed as the mean from subsampled datasets \pm standard error of the mean.

Differences of the sites (richness estimator), reciprocal Simpson index (microbial biodiversity estimator), or the population evenness (derived from Simpson index), were observed between the 6 sites of the study (Kruskal–Wallis H test was corrected for multitesting with Dunn’s test). The study allowed us to highlight 2,021 phyla including 6 major phyla at different sample collection sites (figure 3) and the relative abundance of taxa identified by metagenetics at the genus level (figure 4)

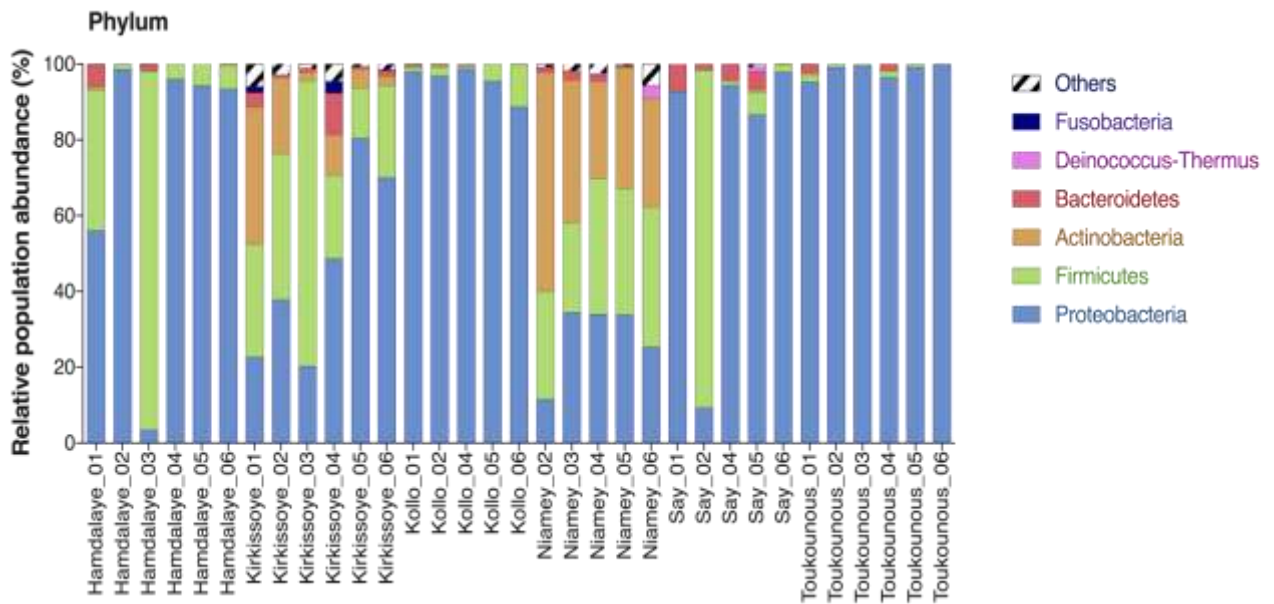


Figure 3: Relative abundance of the 6 phyla common to the 36 raw milk samples. Only the most abundant phylotypes are coloured.

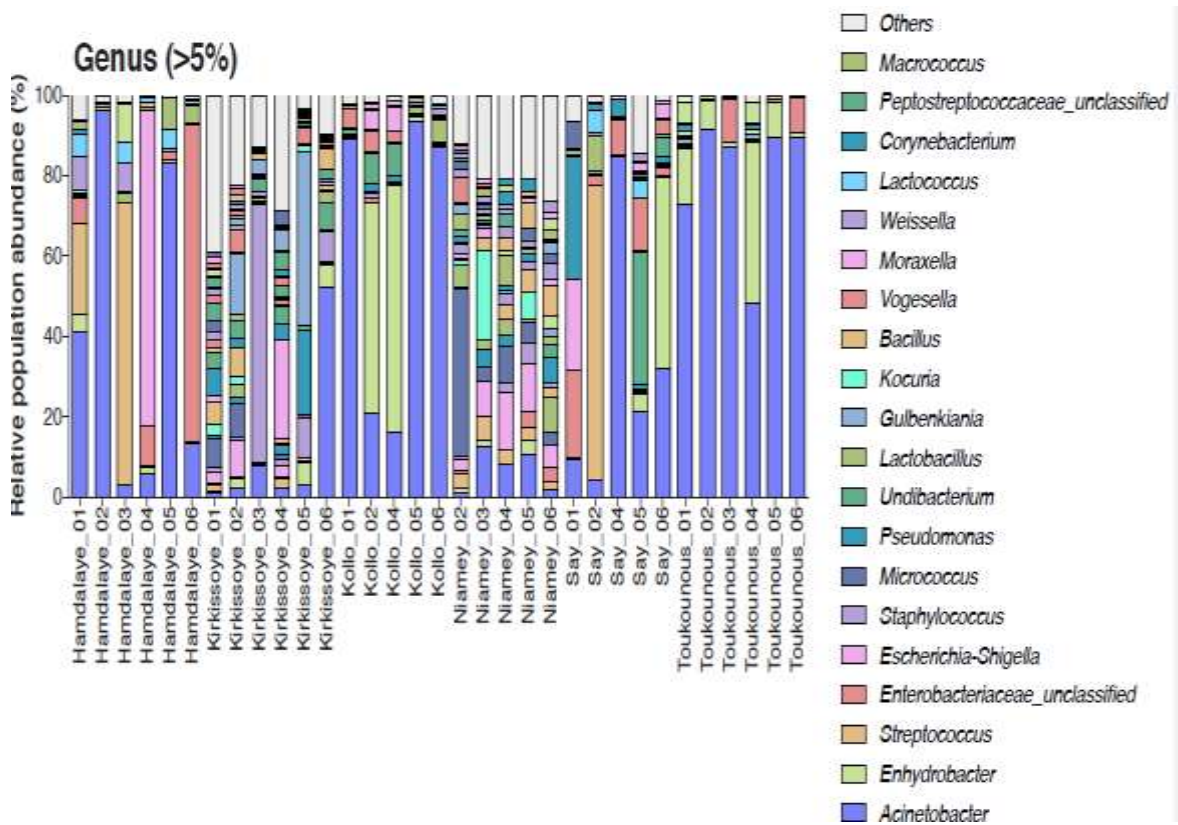


Figure 4: Bacterial genera found in the raw milk samples from the 6 sites. Only the most abundant genera are colored. At genus level, the taxa representing <5% in relative abundance were merged in the category of others.

From January 2016, we collected raw cow milk samples from three farms and three collection centres, resulting in a total of 36 collected samples. A total of 1,372,797 to 1,108, 723 high-quality 16

S rRNA gene reads were obtained by high-throughput DNA sequencing that met quality-filtering requirements. To compare the samples without statistical bias, the minimal read number 3,823, as a normalization size for each sample was chosen for calculation of the diversity indices. The operational taxonomic unit (OTU), or group of 16S rRNA genes, was set at 81% similarity to estimate the diversity of the bacterial community. After all samples were grouped, a total of 3,412 OTUs (singleton OTU 1,765) were obtained.

Phylogenetic and taxonomic assessments of the 16 S rRNA V1–V3 regions revealed that the diversity of bacterial populations in the raw milk greatly varied among the six sites of sampling. Based on the OTU evaluation, the total estimated bacterial richness per sample differed between each site. The milk collected from Kirkissoye contained higher species richness according to the ACE and Chao index. Similarly, a higher number of OTUs was observed in milk examined from Kirkissoye than Niamey.

Taking into account the aim of the present study, the metagenetic results were merged in order to compare bacterial diversity and sampling areas. Figure 3 shows the relative population abundance at phylum levels while figure 4 depicts the distribution of bacterial genera found in the raw milk samples from the 6 sites. These figures and supplementary table 1 highlight the statistical differences between the three farms and the three collection centres of raw milk. For all sites of sampling, at the phylum level, *Proteobacteria* were more abundant at Toukounous (98.2% mean relative frequency), Kollo (95.5%) and Say (76.2%) compared to Hamdallaye (73.6%), Kirkissoye (46.6%) and Niamey (27.8%). The situation was opposite for *Firmicutes*, which were more abundant at Kirkissoye (33.9%); Hamdallaye (24.8%), and Niamey (31.6%), Say (16.6%), and the abundance of this phylum was less than 5% at Kollo, and Toukounous (Figure 3).

Finally, at the genus level, the most important differences were observed with *Acinetobacter*, *Enhydrobacter*, *Streptococcus*, which were more abundant at Toukounous (79.8%; 12.1%; 0% respectively), Kollo (61.4%; 23.2%; 0.1%) and Hamdallaye (40.5%; 1.1%; 15.7%) compared to Say (30.4%; 10.4%; 14.9%), Kirkissoye (11.4%; 2.4%; 0.7%) and Niamey (6.9%; 1.2%; 3.6%), while *Lactobacillus* was significantly more abundant at Niamey (4.2%) compared to the others sites (less than 1%). According to the correlation analysis among 444 genera, many genera exhibited significant correlations with raw milk quality parameters, such as total bacterial count (TBC) and psychrotrophic bacteria.

There were four genera (*Staphylococcus*, *Escherichia*, *Chryseobacterium*, and *Cloacibacterium*) that showed a great influence on the quality of raw milk and the health status of milking cows. Only *Pseudomonas* was found to be positively correlated with psychrotrophic bacteria.

DISCUSSION

The aim of this study was to assess the use of two analytical methods (a classical microbiological method and metagenetics) to see if there were any differences in the bacterial contamination of raw milk from the six sampled sites. The metagenetic approach was used in order to complement the classical method with an exploration of the microbiota present in raw milk. Indeed, molecular technologies can further examine the microbial community by including the identification and quantification of non-culturable organisms, and can perform at a higher resolution to what was previously possible using culture-based methods (Ahn et al., 2011; Korsak et al., 2016).

Milk, considered a complete food, is an important part of people's daily diet around the world in general, and in sub-Saharan Africa in particular. Milk usually contains a low bacterial load when it leaves the udders of a healthy cow, but is quickly colonized by microorganisms afterwards (Quigley et al., 2013). The presence of contamination flora, such as total coliforms and *Escherichia coli*, at Hamdallaye (5.2×10^4 CFU/ml for coliforms and 7.3×10^3 CFU/ml for *E. coli*) is more than the other collection centres and farms because Hamdallaye has many breeders with different methods of milking and levels of hygiene practice. Regarding the level of contamination for *E. coli* and coliforms, no significant difference was observed between the farms and the collection centres. The contamination of raw milk with coliforms and *E. coli* is related to poor hygiene during milking or unwashed utensils used for milking, or are related to infection of the cow's udders (Farougou et al., 2011; Bonfoh et al., 2002; Yamani et al., 1999; Villar et al., 1996).

This same observation was made on milk samples collected and analyzed in Malaysia (Chye et al., 2004), Pakistan (Farhan and Salik, 2007), and Ivory Coast (Kouamé-Sina, 2013). Dairy herd health, milking, and pre-storage conditions are also factors that have a significant influence on milk quality (Aumaitre, 1999). The presence of total coliforms does not necessarily indicate direct faecal contamination of milk, but it is considered an indicator of poor hygienic and sanitary practices during milking and post-handling (Farougou et al., 2011; Chye et al., 2004). The presence of the faecal indicator *E. coli* indicates the presence of other pathogenic bacteria of digestive origin in the sample (Chye et al., 2004).

Mean microbial counts of total coliforms and *Escherichia coli* obtained in this study for all sampling sites were 1.6×10^4 CFU/ml and 5.1×10^3 CFU/ml, respectively. Table 2 summarizes the microbiological results for these 2 parameters reported in the scientific literature. The microbiological quality of raw milk was in general better in other countries than in Niger, except in Burkina Faso for *E. coli* and in Morocco for total coliforms.

Table 2: Contamination of raw milk observed in the literature

Countries	Total coliforms (CFU/ml)	<i>E.coli</i> (CFU/ml)	References
Benin	9.2x10 ²	0.4x10 ¹	Farougou et al., 2011
Burkina Faso	ND	7.9x10 ⁴	Marietou Sissao et al., 2015
Djibouti	7.9x10 ³	3.9x10 ²	Mohamed et al., 2017
Ethiopia	3.2x10 ²	ND	Haile et al., 2012
Malaysia	1.6x10 ⁵	1.6x10 ³	Chye et al., 2004
Morocco	1.6x10 ⁶	ND	Ounine et al., 2004
Morocco	1.9x10 ⁴	ND	Afif et al., 2008
Pakistan	3.2x10 ²	ND	Farhan and Salik, 2007
USA	2.5x10 ³	1.6x10 ²	Jayarao and Wang in 1999

Legend ND: not determined

The lower presence of total coliforms and *Escherichia coli* in some areas of study could be explained by the presence of bacterial inhibitors used for the conservation of milk and non respect of withdrawal period for treated animals. Similar cases with raw milk have been observed in the Ivory Coast, with 24.7% of antibiotic-positive samples (Kouamé-Sina, 2010), Mali with 16% positive samples (Bonfoh et al., 2003), Benin with 83% (Mensah et al., 2014), and Mauritania with 11% positive samples (Issa, 2012).

Staphylococcus aureus with positive coagulase was present in raw milk samples analysed at all sites with a median value of 1.3x10⁴ CFU/ml, which does not in conform with the microbiological health criteria defined in the European Union Regulation Council N°853/2004 and N°2073/2005 of the European parliament and of the Council of 29 April 2004 (not more than 5.01x10² CFU/ml). The contamination with *Staphylococcus aureus* comes from cows with mastitis, from the milkers, or from poor hygiene management for several farms without good hygiene practice (Issa, 2015). *Staphylococcus aureus* was also recognized as a causative agent for clinical and subclinical mastitis in cattle (Benhamed, 2014; Issa, 2015). These results (1.3x10⁴ CFU/ml) were lower than those of Bonfoh (2002) who obtained 2.9 10⁴ CFU/ml, and more than that reported by Kouamé-Sina (2013) who obtained in his study 7.1 10³ CFU/ml. The bacteria's presence in food can be a risk to human health, as these bacteria produce enterotoxins that can cause food intoxication (Barathy et al., 2015). Classical microbiology gives us an idea of the quality of raw milk at the collection centres and farms in order to assess the microbiological health risks related to consumption.

This first metagenetic analysis of raw milk in Niger highlighted the dominance, richness, and homogeneity of bacterial populations with direct impact on the subsequent development of dairy products. In relation to the bacterial diversity, richness and evenness, no statistical difference has

been observed between the sites of sampling. However, systematically, a higher level of bacterial richness was observed at Kirkissoye in comparison to the others sites. There was no difference in bacterial diversity between the sites but a higher difference in bacterial evenness was observed in Niamey than the others sites of sampling. An explanatory hypothesis may be that hygiene practices were different during milking and cleaning of milk collection containers, showing that even the environment can play a role in milk microbiota (Li et al., 2018). Niamey and Kirkissoye are closely in contact with environmental pollution from the capital of Niger. The diversity, abundance, and homogeneity of raw milk is directly dependent on the composition of the microbiota of the bacterial reservoirs in contact with the milk, and also the breeding system, milking conditions, and wider environment (Li et al., 2018). A complementary study is needed to clearly confirm these assumptions, as this study was performed on a limited dataset.

By comparing our results with a similar study on milk and foods of animal origin (Chaillou et al., 2015; Korsak et al., 2016; Li et al., 2018), it appears that environmental contamination through water, feed, and soil seems to affect the microbial spoilage population in food more than animal contamination. This was also true regarding the bacterial diversity and distribution that were found at Kirkissoye and Niamey. Another limitation is the evaluation of the 16S rRNA gene region. For the present study, we chose to target the V1–V3 hypervariable region, which is a longer target than the V3–V4 region, and therefore has a better discriminating power for genus and species resolution. This choice was also based on the fact that the V1–V3 and V1–V4 regions are able to more accurately identify a larger array of bacteria without over or underestimation. Moreover, the V1–V3 region is known to have a better discrimination of lactic acid bacteria, which makes it more appropriate for dairy industries (Delcenserie et al., 2014; Ceugnez et al., 2016).

The phylum-level structure of the bacterial communities detected in the study was similar to those found previously (Li et al., 2018; Quigley et al., 2013). The most important phyla in abundance were *Proteobacteria* ($p < 0.0003$), *Firmicutes* ($p < 0.1$) at all the sampling sites. These were phyla found especially on the teat surface of cows (Braem et al., 2012; Monsallier et al., 2012; Verdier-Metz et al., 2012). The *Proteobacteria* have already been found isolated in milk and meat (Delcenserie et al., 2014; Korsak et al., 2016), and also found in the environment, teat surface, and hay (Vacheyrou et al., 2011). Li et al. (2018) found *Proteobacteria* and *Firmicutes* to be abundant in raw milk, and exhibited a counter balanced relationship because these microorganisms compete with each other for ecological niches.

At genus level, the main findings of the present study were a higher abundance of *Acinetobacter*, *Enhydrobacter*, and *Streptococcus* in all the sites samples. The *Acinetobacter* genus of the *Proteobacteria* phylum are mainly aerobic Gram-negative coccobacilli commonly present in soil and water as free-living saprophytes. Some species are also common commensals of the skin, throat,

and secretions of healthy people. In humans, *Acinetobacter baumannii* causes pneumonia and other nosocomial infections that are difficult to treat because of the global spread of strains with resistance to multiple antibiotic classes (McConnell et al., 2011; Hakyemez et al., 2013). The environment is the main reservoir of *Acinetobacter* spp. and, interestingly, the bacteria have mainly been isolated from sites in contact with humans, animals, or in areas polluted with hydrocarbons (al Atrouni et al., 2016).

Acinetobacter was the main genus present in both farms and collection centres in our analysed samples. A greater abundance of *Acinetobacter* were found in Toukounous farms, possibly due to the presence of only one breed of cow; but this hypothesis needs to be confirmed by more extensive research. *Acinetobacter* is a source of milk spoilage (Quigley et al., 2013). This bacterium could reduce the shelf life of some products due to the production of lipases and proteases, which are generally thermostable and cause taste defects. Similar enzymes have been found to cause pigment defects or stickiness (De Filippis et al., 2013; Korsak et al., 2016).

The *Enhydrobacter* genus of the *Proteobacteria* phylum was found in abundance in the samples from Say, Toukounous, Kollo, but comprised less than 2% of the bacterial population in Hamdallaye, Niamey, and Kirkissoye. This bacterium has never been previously identified in raw milk, but has been isolated several times in water. The contamination in our study may be related to the use of well or river water for washing utensils and drinking water for animals. This bacterium was also found in a meat cutting plant in France (Khamisse, 2012). We found a member of the *Streptococcus* genus of the *Firmicutes* phylum that was taxonomically close to *Streptococcus agalactiae*, a causative agent of mastitis in dairy cows (Trijbel-Smeulders et al., 2004; Chiang et al., 2008) and sepsis, meningitis, and pneumonia in humans, especially newborns (Kouamé-Sina., 2013).

With respect to the roles of the microorganisms in milk (Li et al., 2018), four kinds of microorganisms were confirmed, including genera that facilitate dairy fermentation, cause spoilage, promote health, and cause disease according to the classical microbiology and metagenomic. In this study, the genera *Acinetobacter* (Toukounous (79.8%); Kollo (61.4%); Hamdallaye (40.5%)), *Escherichia* (Hamdallaye (13.1%); Niamey (8.5%) and Say (4.7%)) and *Staphylococcus* (Kirkissoye (14.2%) and Niamey (1.7%)), which could cause disease, were identified in our raw milk samples and their proportion of the total microbiota coincided with level of cow health quality control in each site. *Staphylococcus* is a genus of pathogenic microorganism that is commonly associated with foodborne illness, especially through milk and dairy products. Intoxication results from the ingestion of staphylococcal enterotoxins (SE) produced in food by *S. aureus* strains (Derzelle et al., 2009). It should be noted that pasteurization destroys these bacteria, but not the enterotoxins produced in the milk (Ericsson et al., 2009). *Chryseobacterium* is an opportunistic pathogen that causes a broad spectrum of illnesses (Stratev and Odeyemi, 2016)

The genera *Pseudomonas* and *Bacillus* are known to play important roles in causing spoilage after long periods of cold incubation (Kim et al., 2017). *Pseudomonas* had been identified as the main type of bacterial contamination in pasteurized milk at the end of its shelf life when stored at a temperature of 4°C (Smithwell and Kailasapathy, 1995). However, food and storage conditions could also have a selective effect on a portion of the microbial population (Korsak et al., 2016; Stellato et al., 2015; Pothakos et al., 2014). *Lactococcus* and *Lactobacillus* were frequently described as the main source of lactic acid producing strains mainly found in raw milk cheese (Taïbi et al., 2011; Delcenserie et al., 2014; Ceugniz et al., 2016) and they have significant role in health promotion for raw milk consumers (Quigley et al., 2013). The contamination of raw milk with these bacteria usually derives from flora present in infected udders, and from the external environment during the various manipulations involved in the milking process (Brouillette et al., 2004; Von Eiff et al., 2006).

In this study, genera with negative and positive roles were abundant. These genera can be introduced depending on the level of hygienic quality control for cow breeds and the raw milk production process itself (Nan et al., 2018). The importance of management practices regarding enclosure hygiene, equipment hygiene, and environmental factors should have a significant effect on the quality of raw milk. The poor microbiological health quality observed in the present study requires further investigation, particularly on the animal's health, and the effect of milker's ability to assess their contribution to microbial health quality.

CONCLUSION

This first metagenetic study of raw milk samples in Niger (Africa) showed that the characterisation of the microbiota of raw milk from 6 sampling sites successfully surveyed the bacterial communities present in raw milk. The use of targeted metagenetic analysis allowed us to identify the different phylotypes of raw milk, showing the biodiversity of our samples. Our approach should be considered as a technique for quality control of milk in farms and collection centres and, indeed, it may be useful to determine the source of raw milk contamination. Based on these results, we can say that raw milk from the study area may present a health risk. Further investigations are required to provide insightful data on the discovered bacterial strains and separate those which have beneficial properties. In future, milk hygiene training for milking breeders will help protect the consumer against foodborne diseases in this area.

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was carried out the financial support of West African Agriculture Productivity Program (PPAAO/WAAP) of Niger. We thank Dr Moumouni Harouna and the breeders for their contributions.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

AMM: Principal author, this article was written as part of my PhD in Food Hygiene and Quality (Department of Food Science). BT: Supervision for laboratory analysis and article writing. VD and GD: members of thesis committee who validated the results. MH: administrative support for the compilation of data. NK: PhD supervisor validated the work before submission.

REFERENCES

Afif, A., Faid, M., Chigr, F., and Najimi, M. (2008). Survey of the microbiological quality of the raw cow milk in the Tadla area of Morocco. *International Journal of Dairy Technology* 61, No 4, pages 7.

Ahn, J., Yang, L., Paster, B.J., Ganly, I., Morris, L., Pei, Z., and Hayes, R.B. (2011). Oral microbiome profiles: 16S rRNA pyrosequencing and microarray assay comparison. *PLoS One* 6(7): e22788. doi:10.1371/journal.pone.0022788

al Atrouni, A, Joly-Guillou, M.L., Hamze, M. and Kempf, M. (2016). Reservoirs of Non *baumanii Acinetobacter* species *Frontiers in microbiology* Mini review 1 février 2016 DOI 10.3389/fmicb.2016.00049.

Aumaitre A., (1999). Quality and safety of animal products. *Livestock Product. Sci.*, 59, pages-113–124.

Barathy, S., Lakshmanasami, G., Kannan, P., and Munnisamy, B. (2015). Prevalence of *Staphylococcus aureus* in raw milk: Can it be a potential public health threat. *Int. J. Adv. Res.* p7

Bell, C., Greenwood, M., Hooker, J., Kyriakides, A., and Rebecca M. (1997). Development and use of microbiological criteria for food. *Food Science and Technology Today*, 11, 137-176

Benhamed, N. (2014). Evaluation de la qualité microbiologique et sanitaire du lait cru dans la région d'Oran, Algérie. Etude du profil moléculaire virulent des *staphylococcus aureus* impliquées dans les mammites bovines. Thèse de doctorat en microbiologie Appliquée. Université d'Oran. Algérie 141p.

Bonfoh, B., Fané, A., Traoré, N.A., Coulibaly, Z., Simbé, C.F., Alfaroukh, O.I., Nicolet, J., Farah, Z., and Zinsstag, J. (2002). Qualité microbiologique du lait et des produits laitiers vendus en saison chaude dans le district de Bamako au mali, BIOTERRE, Rev. Inter. Sci. de la Vie et de la Terre, N° spécial, -1-9p.

Bonfoh, B., Fane, A., Steinmann, P., Hetzel, M., Traore, A.N., Traore, M., Simbe, C.F., Alfaroukh, I.O., Nicolet, J., Akakpo, J.A., Farah, Z., and Zinsstag, J. (2003). Qualité microbiologique du lait et des produits laitiers vendus au Mali et leurs implications en santé publique, -9 pages.

Braem, G., De Vliegher, S., Verbist, B., Heyndrickx, M., Leroy, F., and De Vuyst L. (2012). Culture-independent exploration of the teat apex microbiota of dairy cows reveals a wide bacterial species diversity. *Vet Microbiol* 157:383–390. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.12.031>.

Brouillette, E., Grondin, G., Talbot, B.G., and Malouin, F. (2004). Inflammatory cell infiltration as an indicator of *Staphylococcus aureus* infection and therapeutic efficacy in experimental mouse mastitis. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 104(2005) 163-169.

Ceugniz, A., Taminiou, B., Coucheney, F., Jacques, P., Delcenserie, V., Daube, G., and Drider D. (2016). Use of a metagenetic approach to monitor the bacterial microbiota of “Tomme d’Orchies” cheese during the ripening process. *International Journal of Food Microbiology*.21p.

Chaillou, S., Chaulot-Talmon, A., Caekebeke, H., Cardinal, M., Christieans, S., Denis, C., Helene Desmots, M., Dousset, X., Feurer, C., Hamon, E., Joffraud, J.-J., La Carbona, S., Leroi, F., Leroy, S., Lorre, S., Mace, S., Pilet, M.-F., Prevost, H., Rivollier, M., Roux, D., Talon, R., Zagorec, M., and Champomier-Verges, M.-C. (2015). Origin and ecological selection of core and food-specific bacterial communities associated with meat and seafood spoilage. *International Society for Microbial Ecology J* 9, 1105-1118.

Chiang T.M. and Rasberay V.W. (2008). Development of a dynamic system simulating pig gastric digestion. *Asian-Aust.J.Anim.Sci* vol.21,N°10:1522-1528.

Chye F., Abdullah A., and Ayob M. (2004). Bacteriological quality and safety of raw milk in Malaysia. *Food Microbiology*, 21,pp- 535–541.

Cock P.J.A., Fields C.J., Goto N., Heuer M.L., and Rice P.M. (2010). The sanger FASTQ file format for sequences with quality scores and the solexa/illumine FASTQ variants. *Nucleic Acid Research* 38(6): 1767-1771 DOI 10.1093/Nar/gkp1137.

De Filippis, F., La Stora, A., Villani, F., Ercolini, D. (2013). Exploring the sources of bacterial spoilers in beefsteaks by culture-independent high-throughput sequencing. *PLoS ONE* 8(7): e70222. doi:10.1371/journal.pone.0070222.

Delcenserie, V.; Taminau, B., Delhalle, L., Nezer, C., Doyen, P., Crevecoeur, S., Roussey, D., Korsak, N., and Daube, G. (2014). Microbiota characterization of a Belgian protected designation of origin cheese, Herve cheese, using metagenomic analysis. *Journal of Dairy Science* 97, 6046-6056.

Derzelle, S, Dilasser, F, Duquenne, M, and Deperrois, V. (2009). Differential temporal expression of the staphylococcal enterotoxins genes during cell growth. *Food Microbiol.* 2009 Dec;26(8):896-904. doi: 10.1016/j.fm.2009.06.007. Epub 2009 Jun 17

Edgar, R.C., Haas, B.J., Clemente, J.C., Quince, C., and Knight, R. (2011). UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics*; 27:2,194–2,200.

Esposito, A., and Kirschberg, M. (2014). How many 16S-based studies should be included in a metagenomic conference? It may be a matter of etymology. *FEMS Microbiology Letters* 351,145-146

European Commission (2004). Commission Regulation (EC) N° 853/2004 of 29 April 2004 laying down specific hygiene rules for on the hygiene of foodstuffs. *Official Journal of the European Union* L 139,55.

European Commission, (2005). Commission Regulation (EC) N° 2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs. *Official Journal of the European Union* L 338,36.

Ericsson, V., Lindberg, A., Persson, W.K, Ekman, T., Artusson, K., Nilson-ost, M., and Bengtsson, B. (2009). Microbial aetiology of acute clinical mastitis and agent specific risk factors. *Vet Microbiol.* 2009 May 28; 137(1-2) :90-7.

Escobar-Zepeda, A., Godoy-Lozana, E. E., Raggi, L., Segovia, L., Merino, E., Gutiérrez-Rios, R. M., Juarez, K., Licea-Navarro, A.F., Pardo-lopez, L., and Sanchez-Flores, A. (2018). Analysis of sequencing strategies and tools for taxonomic annotation: Defining standards for progressive metagenomics. *Scientific reports* 8:12034 DOI: 10.1038/s41598-018-30515-5.

FAO. (1992). *Le lait et les produits laitiers dans la nutrition humaine.* -Rome : FAO, pp-205-340. -(Collection FAO, Alimentation et Nutrition ;28).

Farhan, M., and Salik, S. (2007). Evaluation of Bacteriological Contamination in Raw(Unprocessed) Milk Sold in Different Regions of Lahore (Pakistan), Journal of agriculture & social sciences, 3,pp- 104–106.

Farougou, S., Kpodékon, T.M., Sessou P., Youssao, I., Boko, C., Yèhouenou, B., and Sohounhloùé, D. (2001).Qualité microbiologique du lait cru de vache élevée en milieu extensif au Bénin. Actes du 3^{ème} Colloque des Sciences, Cultures et Technologies de l'UAC-Bénin,-333-1-15pp.

Gagara, M., Philippe, S., Serge, A., Paulin, A., Issaka, Y., Souaïbou F., and Soumana. G.A. (2017). Analyses of constraints related to milk production in Liptako Gourma in Niger. African Journal of Agricultural Research. Vol. 12(23), pp. 1949-1958

Ghafir, Y., and Daube, G. (2008). Comparison of swabbing and destructive methods for microbiological pig carcass sampling. Letters in Applied Microbiology 47, 322-326.

Haile, W., Zelalen, Y. and Yosef, T.G. (2012).Hygienic practices and microbiological quality of raw milk produced under different farm sizes in Hawassa, Southern Ethiopia. Agricultural Research and reviews Vol 1(4),pp.132-142,May2012

Hakyemez, I. N., Kucukbayrak, A., Tas, T., Yikilgan, A. B., Akkaya, A., Yasayacak, A., and Akdeniz, H. (2013). Nosocomial *Acinetobacter baumannii* infections and changing antibiotic resistance. Pak.J.Med.Sci. 29(5) :1245-1248.

Hutchison, M.L., Walters, L.D., Avery, S.M., Reid, C.A., Wilson, D., Howell, M., Johnston,A.M., and Buncic, S. (2005). A comparison of wet-dry swabbing and excision sampling methods for microbiological testing of bovine, porcine, and ovine carcasses at red meat slaughterhouses. Journal of Food Protection 68, 2155-2162.

ICMSF,(1986). Microorganisms in Foods 2. Sampling for microbiological analysis: Principles and specific applications 2nd Ed. International Commission on Microbiological Specifications for Foods, -278 p.

IDF (1990). Hand book on milk collection in warm developing countries. IDF special issue N°9002 Brussels (Belgium), pp.1-148.

INS,(2016). Le Niger en chiffre 2016.[on line]-Internet Access.www.stat-niger.org/statistique/file/Affiches.../Nigerenchiffres2016def.pdf(consulted 16.11.2018)

International Organization for Standardization, (1999). Microbiology of food and animal feeding stuffs-Horizontal method for the enumeration of coagulase positive staphylococci (*Staphylococcus aureus* and others species)- Part 1: Technique using Baird parker agar medium. Geneva ISO 6888-1:1999 pages 11.

International Organization for Standardization (2005). Microbiology of food and animal feeding stuffs Horizontal method for the detection and enumeration of presumptive *Escherichia coli*. Geneva ISO 7251:2005 pages 13.

Issa I. A. (2015). Bilan bactériologique des mammites dans les troupeaux Zébu Azawak à la station expérimentale sahélienne de Toukounous et épidémiologie moléculaire des staphylococcus aureus isolées entre 2009-2012. Thèse : Sc Vét : Liège ; 160p

Issa, G.A. (2012). Evaluation des pratiques d'utilisation des médicaments vétérinaires et détermination de la prévalence des résidus d'antibiotiques dans la viande et le lait dans le Gorgol en Mauritanie. Mémoire Master Méd. Vét, Sénégal. 31p

Jayarao, B.M. and Wang, L. (1999). A study of prevalence of gram-negative bacteria in bulk-tank milk. *J. Dairy Sci.*, 82, pp-2602–2604.

Khamisse, E. (2012). Etude du microbiote susceptible de persister sur les surfaces d'un atelier de la filière viande bovine. Sociologie. AgroParisTech, 2012. Français. ffNNT : 2012AGPT0036ff. ffpastel-00770326f

Kim, I.S, Hur, Y.K., Kim, E.J., Ahn, Y.T., Kim, J.G., Choi, Y.J., and Huh, C.S. (2017). Comparative analysis of the microbial communities in raw milk produced in different regions of Korea. *Asian-Australas J Anim Sci* 30:1643-1650

Kouamé-Sina, S.M, (2013). Contribution à la gestion des risques de contamination microbienne et diversité génotypique des espèces du genre *Bifidobacterium* isolées de la chaîne de production du lait local à Abidjan (Côte d'Ivoire) : Thèse unique. Université Nangui Abrogoua. Côte d'Ivoire. Pages 234.

Korsak, N., Taminiau, B., Huppert, C., Delhalle, L., Nezer, C., Delcenserie, V. and Daube, G. (2016). Assessment of bacterial superficial contamination in classical or ritually slaughtered cattle using metagenetics and microbiological analysis. *International Journal of Food Microbiology* p 8.

Li, N., Wang, Y., You, C., Ren, J., Chen, W., Zheng, H., and Liu, Z. (2018). Variation in Raw Milk Microbiota throughout 12 Months and The Impact of Weather conditions. *Scientific Reports* 8:1-10. Doi:10.1038/s41598-018-20862-8.

Marichatou, H., Kore, H.M., Motcho, H.K. and Vias, G. (2005). Synthèse bibliographique sur les filières laitières au Niger.- Niamey : Réseau de recherche et d'échanges sur les politiques laitières.- 40p.

Marietou, S., Vinsun, M., and Georges A.O. (2015). Composition Chimique et qualité bactériologique des laits crus et pasteurisés au Burkina Faso. *Afrique Science* 11(1) (2015) 142-154.

McConnell, M.J., Luis, A., and Pacho, J. (2011) *Acinetobacter baumannii*: human infections, factors contributing to pathogenesis and animal models. *FEMS Microbiol Rev* 37 (2013) 130–155

Mensah S.E.P., Koudandé O.D., and Sanders P., (2014). Résidus d'antibiotiques et denrées d'origine animale en Afrique : risques de santé publique, *Article Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, n°10062014-00034-FR. 27p.

Mohamed, A.F., Somda M.K., Fourreh A.E., Okieh A.A., Said C.N., Mérito A and Yagi S. (2017). Evaluation of Microbiological quality of raw milk from farms and dairy producers in six districts of Djibouti. *J.Food Microbiol.Saf. Hyg.* 2017.

Monsallier, F., Verdier-Metz, I., Agabriel, C., Martin, B., and Montel, M.-C., 2012. Variability of microbial teat skin flora in relation to farming practices and individual dairy cow characteristics. *Dairy Sci. Technol.* 92, 265–278. doi:10.1007/s13594-012-0064-7.

Nan, L., Yuezhu, W., Chunping, Y., Jing, R., Wanyi, C., Huanjan, Z., and Zhenmin, L. (2018). Variation in raw milk microbiota throughout 12 months and the impact of weather condition. *Nature/scientific reports*. pp 10.

Ngo, J., Taminiau, B., Fall, P.A., Daube, G., and Fontaine, J. (2018). Ear canal microbiota- a comparaison between healthy dogs and atopic dogs without clinical signs of otitis externa. *Vet Dermatol* 29:425-e140.

OMS, FAO, (2007). Lait et produits laitiers, 1ère édition. Codex alimentarius, Rome, 2007- 258 p.

Organisation Mondiale de la Santé (OMS), (2007). Salubrité des aliments et maladies d'origine alimentaire. Aide-mémoire n°237-2007.

Ounine, K., Rhoutaïsse, A., and El haloui, N.E. (2004). Caractérisation bactériologique du lait cru produit dans les étables de la région du Gharb. *Al Awamia*, 110, pp 187–204.

Pothakos, V., Taminiâu, B., Huys, G., Nezer, G., Daube, G., and Devieghere, F. (2014). Psychrotrophic lactic acid bacteria associated with production batch recalls and sporadic cases of early spoilage in Belgium between 2010 and 2014. *Int.J.Food Microbiol.* 191,157-163.

Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., Peplies, J., and Glöcker F.O. (2012) The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and webbased tools. *Nucleic Acids Res*; 41: D590–D596.

Quigley, L., O’Sullivan, O., Stanton, C., Beresford, T.P., Ross, R.P., Fitzgerald, G.F., and Cotter, P.D. (2013). The complex microbiota of raw milk. *FEMS Microbiol. Rev.* 37, 664–698

Rodriguez, C., Taminiâu, B., Brevers, B., Avesani, V., Van broeck, J., Leroux, A., Gallot, M., Bruwier, A., Amory, H., Delmee, M., and Daube, G. (2015). Faecal microbiota characterisation of horses using 16 rDNA barcoded pyrosequencing, and carriage rate of *Clostridium difficile* at hospital admission. *BMC Microbiology* 15, -181.

R. Development Core Team (2008). R: A language and environment for statistical computing. R. Foundation for Statistical computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL [http:// www.R-project.org](http://www.R-project.org)

Rhissa, Z. (2010). Revue du secteur de l’élevage au Niger, Rapport provisoire (FAO/OMS) ,- 115p.

Stratégie de Développement Rural (SDR), (2006). Comité Interministériel de pilotage de SDR : plan d’action de la SDR pour le secteur rural.

Schloss, P.D., Gevers, D., Westcott, S.L., Ryabin, T., Hall, J.R., Hartman, M., Hollister, E.B., Lesniewski, R.A., Oakley, B.B., Parks, D.H., Robinson, C.J., Sahl, J.W., Stres, B., Thallinger, G.G., Van Horn, D.J., and Weber, C.F. (2011). Reducing the effects of PCR amplification and sequencing artifacts on 16S rRNA-based studies. *PloS one* 6, e27310.

Siousarran, V. (2003). Hygiène du lait cru en zone urbaine et per urbaine de Niamey, Niger. Rapport de Stage de DESS/Productions animales en régions chaudes. Université de Montpellier 2. pp66

Smithwell, N. and Kailasapathy, K. (1995) Psychrotrophic bacteria in pasteurized milk – problems with shelf life. *Australian Journal of Dairy Technology* 50, 28–31

Stellato, G., De Filippis, F., La Stora, A., and Ercolini, D. (2015) Coexistence of lactic acid bacteria and potential spoilage microbiota in a dairy-processing environment. *Appl Environ Microbiol* 81: 7893–7904

Stratev, D. and Odeyemi, O.A. (2016). Antimicrobial resistance of *Aeromonas hydrophila* isolated from different food sources: A minireview. *J. Infect. Public Health* 9, 535–544 (2016).

Taïbi, A., Dabour, N., Lamoureux, M., Roy, D., and Lapointe, G. (2011). Comparative transcriptome analysis of *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* strains under conditions simulating Cheddar cheese manufacture. *Int. J. Food Microbiol.* 146:pp-263–275.

Trijbels-Smeulders, M.A., Kollee, L.A., Adriaanse, A.H., Kimpen, J.L., and Gerards, L.L. (2004). Neonatal group B streptococcal infection: incidence and strategies for prevention in Europe. *Ped Inf Dis J* 23:172-173. DOI 10.1097/01

Vacheyrou, M., Normand, A.C., Guyot, P., Cassagne, C., Piarroux, R., and Bouton, Y. (2011). Cultivable microbial communities in raw cow milk and potential transfers from stables of sixteen French farms. *Int. J. Food Microbiol.* 146, 253–262

Verdier-Metz, I., Michel, V., Delbes, C., and Montel, M.C. (2012). Cow teat skin, a potential source of diverse microbial populations for cheese production. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 326–333

Villar, A., Garcia, J.A., Iglesias, L., Garcia, M.L., and Otero A. (1996). Application of Principal Component Analysis to the Study of Microbial Populations in Refrigerated Raw Milk from Farms. *International Dairy Journal*, 6, pp 937-945.

Von Eiff, C., McNamara, P., Becker, K., Bates, D., Helei, X., Ziman, M., Bochner, B.R., Peters, G., and Proctor, R.A. (2006). Phenotype microarray profiling of *Staphylococcus aureus* menD and hemB mutants with the small-colony-variant phenotype. *J Bacteriol.* 2006 Jan;188(2):687-693

World Health Organisation (WHO), (2014). Antimicrobial Resistance: Global Report on Surveillance; -257p.

Yamani, M.I., Al kurdi I.M.A., Haddadin, M.S.Y., and Robinson, R.K. (1999). A simple test for the detection of antibiotics and other chemical residues in ex-farm milk. *Food Control*, 10, - 35-39.

Section expérimentale

Etude 4 :

Comparative assessment of the microbial communities in raw milk produced from two villages of Niger

Soumis pour publication dans JFST

Amadou Morou Madougou, Bernard Taminiau, Véronique Delcenserie, Georges Daube, Marichatou Hamani, Nicolas Korsak

Préambule

L'étude de la biodiversité microbienne nous a permis de connaître les phyla majoritaires comme *Protobacteria*, *Firmicutes*, *Actinobacter* ainsi que les genres majoritaires à savoir *Acinetobacter*, *Enhydrobacter* et *Streptococcus*. Pour vérifier cette abondance relative, une étude a été menée au niveau des centres de collectes qui constituent un grand risque de contamination bactérienne. Niamey dispose d'un secteur de transformation laitier dynamique en raison d'une forte consommation locale. Elle compte plusieurs unités de transformation laitière du type industriel, et plusieurs autres unités du type semi-industriel ou artisanal (y compris les mini-laiteries). Or la filière lait, telle qu'elle est structurée actuellement, n'est pas viable à cause de l'importation de lait de pays tiers. L'industrie laitière est en mesure de collecter le lait auprès d'un grand nombre d'éleveurs. C'est dans cette optique que les centres de collecte de lait cru ont été créés pour la collecte et la distribution. Il est par ailleurs possible de répondre au souhait des consommateurs de consommer leur production locale en partenariat avec les centres de collecte.

La présente étude rentre dans ce cadre de description afin de comparer les deux plus grands centres de collecte qui peuvent collecter jusqu'à 1000 litres de lait par jour au sein de notre zone d'étude. Peu d'informations ont été rapportées concernant le lait cru en provenance du Niger. Ainsi, le microbiote de lait cru du centre de collecte de Hamdallaye et du centre de collecte de Kollo au Niger a été évalué selon deux méthodes, la microbiologie classique et la métagénomique. Trente (30) échantillons de lait cru en vrac ont été prélevés à Hamdallaye et à Kollo. Des échantillons ont été soumis à la microbiologie classique pour les dénombrements aérobie totaux (TAC) à 30 °C et les dénombrements d'*Escherichia coli* (*E. coli*) et de coliformes totaux, tandis qu'une analyse métagénomique a été effectuée sur les mêmes échantillons. Des bibliothèques d'amplicons d'ADNr 16S hypervariables V1-V3 ont été préparées pour chaque échantillon et séquencées avec la séquence MiSeq Illumina (kit V3). L'assignation taxonomique et le regroupement ont été effectués avec Mothur à l'aide de la base de données SILVA. Cependant, une analyse précise de la taxonomie au niveau du genre met en évidence les différences entre les pratiques de traite. Bien que cela n'ait pas été clairement prouvé dans cette étude, des différences dans les pratiques d'hygiène utilisées pendant la traite et le transport pourraient expliquer les différences de contamination entre les échantillons des groupes Hamdallaye et Kollo.

ABSTRACT

Little information has been reported regarding raw milk from Niger. Therefore, the raw milk microbiota from Hamdallaye collection centre and Kollo collection centre in Niger have been evaluated using two methods, the classical microbiology and metagenetic. Thirty (30) raw bulk milk samples were collected from Hamdallaye and Kollo. Samples were submitted to classical microbiology for Total Aerobic Counts (TAC) at 30°C and *Escherichia coli* (*E. coli*) and coliforms counts, while metagenetic analysis was performed on the same samples. V1–V3 hypervariable 16S rDNA amplicon libraries were prepared for each sample and sequenced with MiSeq Illumina sequence (V3 kit). Taxonomical assignment and clustering were performed with Mothur using SILVA database. The classical microbiological results revealed no significant differences between the samples from Hamdallaye and Kollo collection centres; with respectively means values (in log cfu/ml) of 4.4 ± 0.12 and 4.2 ± 0.16 for TAC and 7.2 ± 0.7 and 7.7 ± 0.7 for coliforms, and 3.2 ± 0.49 and 4.1 ± 0.37 for *E. coli*. Analysis of amplicon sequencing data showed that differences in the bacterial population abundance were observed in the sample with increased abundance of *Klebsiella* and *Chryseobacterium*, *Acinetobacter*, *Enhydrobacter*, *Lactobacillus*, *Weissella* and *Lactococcus* genera for the samples taken in Hamdallaye in comparison with those from Kollo. However, precise analysis of taxonomy at the genus level taxonomy highlights differences between milking practise. Although not clearly proven in this study, differences in hygiene practices used during both milking and transport condition could explain the differences in contamination between the samples from both Hamdallaye and Kollo groups.

Keywords: raw milk, microbiological quality, hygiene, metagenetics, Niger

INTRODUCTION

Milk is recognized as a highly nutritious food. It is composed of a valuable amount of proteins, fat, carbohydrates, vitamins and minerals, providing a good environment for the growth of microorganisms (Quigley et al., 2013). The Food and Agriculture Organization (FAO) indicates in statistics that in developed countries, the average milk consumption is 223.2 kg per year per inhabitant, whereas in developing countries it is estimated at 77.7kg (FAO 2014). Wealth was found to be the major determinant of animal source food consumption in the world (Delgado, 2003). The composition and physical characteristics of milk are favourable to the growth of a wide range of spoilage (*Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Chryseobacterium*, *Clostridium* and phage) and pathogenic microorganisms (*Listeria*, *Staphylococcus*, *Escherichia coli*, *Campylobacter*, *Mycobacterium*, *Fungi-Aflatoxin*) (Quigley et al. 2013). While milk is considered one of the healthiest food, current food recalls and foodborne illness outbreaks due to milk have indicated the need for an in-depth investigation (Li et al., 2018; LeJeune and Rajala-Schultz, 2009; Buehner et al., 2014). In developing countries, data on foodborne diseases are scarce. This is principally because of the lack of operational disease surveillance networks as well as an underreporting of foodborne illness cases (Newell et al., 2010; Stevens et al., 2006; Niyonzima et al., 2016). Bacterial contamination of dairy products is a major concern throughout the world (Gopal et al., 2015). Raw milk usually harbors complex microbial communities (Li et al., 2018). Microorganisms could not only affect milk quality and shelf life but also produce extracellular thermoresistant lipases and proteases, which could result in spoilage (Li et al., 2018). The consumption of raw milk contaminated with pathogens can lead to severe illness (Julien et al., 2008 ; Raats et al., 2011 ; Huck et al., 2007).

The purpose of this study was to compare the levels of hygiene indicator bacteria of two collection centres (Hamdallaye and Kollo) by classical microbiological and metagenetic analysis. The use of metagenetic analysis aimed to get an insight of indigenous bacterial compositions and to enhance the safety and quality of raw milk with high-throughput sequencing technology through 16S rDNA metagenetics (also called metagenomics analysis targeting 16S ribosomal DNA).

MATERIAL AND METHODS

The study was carried out during August 2018 at collections centers, which were in the main dairy region. Two (2) collections centres (Hamdallaye, Kollo) have been considered for sampling (figure 1).

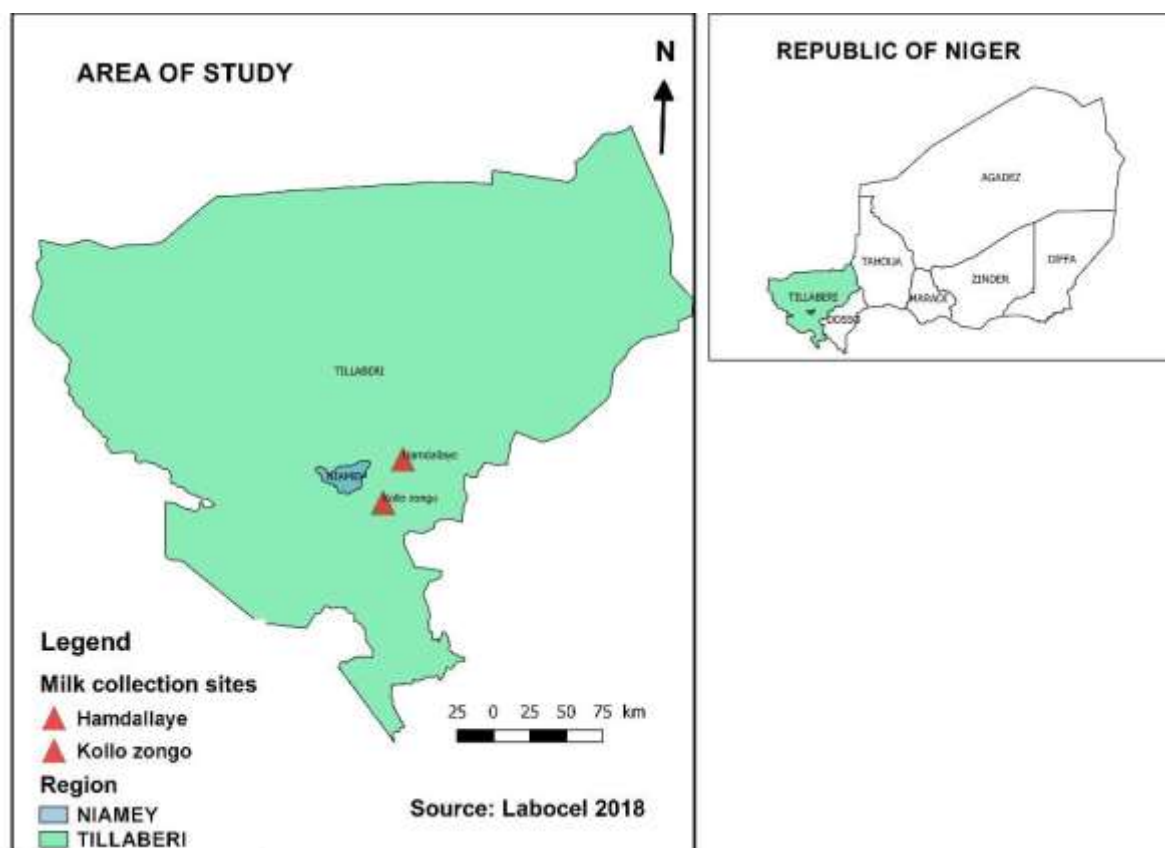


Figure 1: Area of study

The collection centers

The development of the local sector is organized through a milk collection network around the capital city of Niamey, in order to respond to the capital's demand for quality milk from local production. The milk collection centres ensure the collection, control, storage and monitoring of milk quality close to producers, which limits transaction costs, and provides stability at supply points before the production. The collection centres also represent platforms of services to breeders. Collectors are the second link in the chain and have the role of collecting milk from producers. Collectors sell milk directly to collection centres (Issa, 2015). The collection of milk is practiced by both producers and non-producers around Niamey. The quantities of milk collected vary according to the profile of the collector. Those who deliver to the collection centers collect between 30 to 100 liters per day, especially in the morning, depending on their types of transport, whereas collectors specializing in home delivery collect between 4 to 12 liters. The milk is poured in cans of variable capacities sometimes in precarious conditions that accelerate the degradation of the quality of the milk and consequently increase the risk of refusal by the collection centers especially during the dry season. In the study area, milk is produced by local breeds like Azawak, Djelli, Bororo, Goudalli (Mariama et al., 2017) (figure 2).



Figure 2: breeds encountered in the area of study

Milking

Hygiene practices are very poorly developed and are limited to cleaning the instruments used for the milking and cleaning of the holding pens of animals. The maintenance of the pens allows the breeders to value the manure. The hygiene of the milking is limited to washing the collection container. The preparation of the udder and the hygiene of the milking breeder are not common practices in the farms around Niamey. Milking is performed manually, the calf begins feeding for a period of time to initiate the descent of milk, and then the milking breeder continues by attaching the calf to an anterior leg usually the right of the cow. The milking takes place twice a day: in the morning (before going to pasture) and in the evening (returning from pasture). Milking is stopped when the udder no longer releases milk. The milk of collection centres and farms is sold to the dairy industries of the city of Niamey, to cooperatives for the manufacture of cheese and to customers for direct consumption.

Sampling

Thirty random samples of 150 ml of raw mix milk (15 samples from each site) were taken aseptically from the 2 collection centres (Hamdallaye and Kollo) according to standard methods (ICMSF, 1986; IDF, 1990; Bell et al., 1997). The sampling plan and the analysis of the hygienic conditions were implemented in accordance with the requirements of ICMSF (1986) and Codex Alimentarius (FAO and WHO, 2007). The milk samples were transported to the central veterinary laboratory of Niamey (LABOCEL) at a storage temperature between 4°C and 6°C, in a cooler containing dry ice. The time between the sampling and the first analyzes did not exceed 24 hours. In each site, we took mixed milk, that is to say the milk from several cows, several farms and several villages as well as several collectors.

Microbiological analysis

Mesophilic aerobic total counts of bacteria were enumerated using the method specified in ISO 4833:2003. Plate count agar was used and plates were incubated at 30°C for 72h (International Organization for Standardization, 2003). The counts for *Escherichia coli* and coliforms were obtained using the procedures specified by ISO7251:2005 (International Organization for Standardization, 2014). In accordance with other studies, when no colony of *Enterobacteriaceae* was observed in the sample, the value of half the detection limit was assigned (Ghafir et al., 2008; Hutchison et al., 2005; Korsak et al., 2017)

16S rDNA amplicon sequencing

Total DNA extraction and amplicon sequencing

Total DNA was isolated from each primary suspension using the DNeasy Blood and Tissue DNA extraction kit (Qiagen Benelux B.V., Venlo, Netherlands) following the manufacturer's recommendations. The DNA was eluted in DNase / RNase free water, its concentration and purity were evaluated by optical density using the NanoDrop ND-1000 spectrophotometer. The DNA samples were stored at -20°C and kept under the same conditions until they were used for analysis. The fragments of 16S rDNA, targeting the hypervariable region V1-V3 with forward primer (5'-GAGAGTTTGATYMTGGCTCAG-3') and reverse primer (5'-ACCGCGGCTGCTGGCAC-3') were amplified and purified as described previously (Ngo et al., 2018). Sequencing libraries were processed on an Illumina sequencer (Ngo et al., 2018; Ceugniet et al., 2016).

Bioinformatics analysis

Starting from 1,938,786 raw reads, we obtain 1,515,443 reads after cleaning (length and sequence quality) using respectively MOTHUR software package v1.35, and VSEARCH algorithm for alignment (Ngo et al., 2018, Cock et al., 2010) and clustering and chimera detection. The clustering distance for operational taxonomic unit (OTU) is 0.03. 16S rDNA reference alignment and taxonomical assignation were based upon the SILVA database (v1.28) of full-length 16S rDNA sequences. All the BioSample raw reads have been deposited at the National Center for Biotechnology Information (NCBI) and are available under the Bio Project: **PRJNA526665**.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using the R software (version 3.2.5) (R Development Core Team, 2008). One-way analysis of variance was used to assess the variability for normally distributed variables, whereas Mann-Whitney U (MWU) tests were used for non-normally distributed variables. The normality of the distributions was assessed by using the ShapiroWilk test (Shapiro & Wilk, 1965). Sample datasets were obtained and used to evaluate alpha diversity (richness estimation Chao1 estimator, microbial biodiversity reciprocal Simpson index and the population evenness-derived from Simpson index) using MOTHUR. Beta-diversity (bacterial community composition) was assessed with MOTHUR using distance matrix based on Bray–Curtis dissimilarity index and phylogenetic distance matrix using weighted UniFrac and has been evaluated with AMOVA (with 10,000 iterations). Beta dispersion was assessed with HOMOVA (10,000 iterations) in MOTHUR.19 Ordination analysis and 3D plots were performed with Vegan (<https://CRAN.R-project.org/package=vegan>), Vegan3d (<https://CRAN.R-project.org/package=vegan3d>) and rgl packages (<https://CRAN.R-project.org/package=rgl>) in R (R: A Language and Environment for Statistical Computing, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2015; <https://www.R-project.org/>). Principal coordinate analysis (PCoA), based upon the Bray–Curtis dissimilarity matrix was applied to visualize the biodiversity between the groups. Statistical analysis of metagenetic samples was also performed by using PRISM 7 (Graphpad Software; San Diego, CA, USA); differences were considered significant for a P-value < 0.05. Statistical difference of population abundance between groups was assessed with the Mann-Whitney U test corrected for multi-testing with Dunn's test, using STAMP software. The Linear discriminant analysis (LDA) effect size (LEfSe) was used (<http://huttenhower.sph.harvard.edu/galaxy/>) to evaluate the differences in abundance of bacterial taxa between the sites, differences were considered significant for P < 0.05 and LDA score > 3.0.

RESULTS

Classical microbiology analyses do not show statistical significant differences

Figure 3 illustrates the mean adjusted by standard deviation of bacterial loads of Hamdallaye and Kollo samples. No significant difference ($P > 0.05$) was observed between Kollo and Hamdallaye for the bacterial load of the total aerobic count (TAC). After pooling the results from both collection centres for the total flora (in log cfu/ml), an average of 4.3 with a minimum of 3.7 and a maximum of 4.5 were observed.

Relatively high levels of *E. coli* counts were observed in both site with a minimum of 3.7 log cfu/ml and a maximum of 4.5 log cfu/ml. Analyses revealed a significant difference ($p < 0.05$) with an average of 4.1 log cfu/ml at Kollo compared to 3.2 log cfu/ml at Hamdallaye. For coliforms, no significant difference was observed between the two collection centres with a mean of 4.4 log cfu/ml for Kollo and 4.2 log cfu/ml for Hamdallaye.

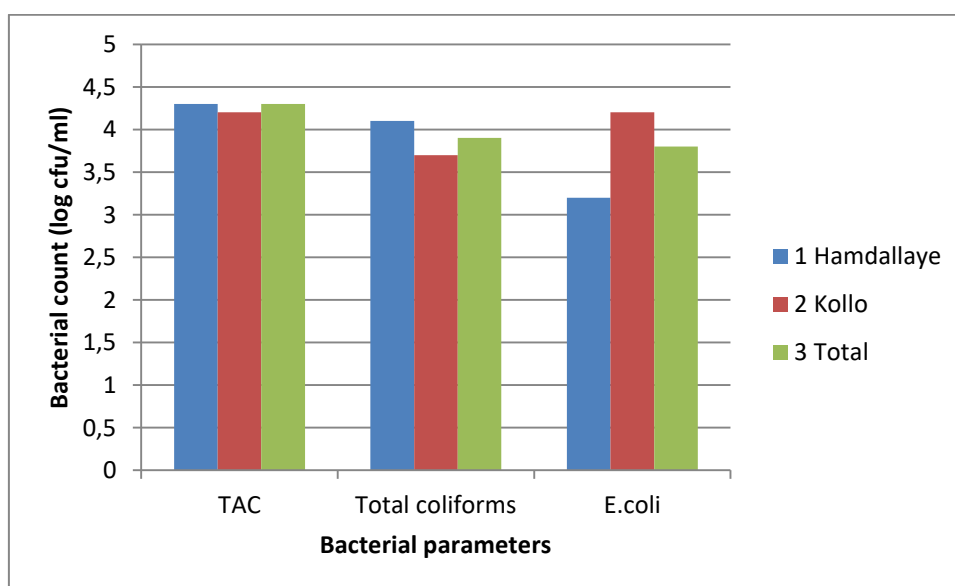


Figure 3: Bacterial parameters

(TAC: Total Aerobic Count) and Total is the mean of the two collection centres

Distribution of bacterial communities identified by 16S rDNA profiling

Microbiota differences between the two groups were evaluated using both the Bray–Curtis (taxonomic evaluation) and weighted UniFrac matrix (phylogenetic approach) and PCoA were constructed to evaluate distance between the groups of samples from Hamdallaye and Kollo. AMOVA analyses revealed that no significant bacterial clustering between the Hamdallaye group and the Kollo

groups ($P > 0.05$) could be observed with the taxonomic approach (Bray–Curtis) (Figure 3) nor with the phylogenetic approach (data not shown). Similarly, HOMOVA analyses showed that the dispersion of the samples of Hamdallaye was no significantly different from those from Kollo ($P > 0.05$) when using the Bray–Curtis matrix nor with the UniFrac matrix (data not shown). Alpha diversity analysis showed no difference between the Hamdallaye group and the Kollo group in the Chao1 richness index (which considers the richness of the microbial community), the reciprocal Simpson biodiversity index (which measures microbial diversity, taking into account both evenness and richness) or the Simpson evenness index (an index that considers how the OTUs were evenly distributed between the groups) (Ngo et al., 2018).

Raw milk microbiota of Hamdallaye collection centre

At Hamdallaye collection centre, a total of 23 phyla were identified in the samples, the most abundant being *Proteobacteria* followed by *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Actinobacteria* and *Chloroflexi*. At the family level, the *Weeksellaceae* (Phylum *Bacteroidetes*; Class *Bacteroidia*; order *Flavobacteriales*) were the most abundant, representing 23% of the total taxa identified. *Enterobacteriaceae*, *Moraxellaceae*, *Leuconostocaceae*, *Streptococcaceae* and *Lactobacillaceae* were also commonly found (between 2.3% and 19% of the families represented). *Chryseobacterium* was the most abundant genus in most of the samples, with a mean of 23.1%, ranging from 0.04% to 95.0%, followed by *Klebsiella*, *Acinetobacter*, undescribed genus of *Enterobacteriaceae*, *Weissella*, *Lactococcus*, *Enhydrobacter* and *Lactobacillus* (between 2.3% and 19% of the genera represented).

Raw milk microbiota at Kollo collection centre

In the group of bacteria at Kollo collection centre, 23 phyla were identified, the most common being *Proteobacteria* followed by *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Actinobacteria* and *Chloroflexi* (Table S4). The most common family found was the *Enterobacteriaceae* representing 37% of the total taxa identified. *Weeksellaceae*, *Moraxellaceae*, *Leuconostocaceae*, *Streptococcaceae* and *Lactobacillaceae* were also commonly found (between 0.9% and 11.2% of the families represented). *Klebsiella* was the most abundant genus in most of the samples, with a mean of 37.2%, ranging from 0.01% to 91.0%, followed by *Chryseobacterium*, *Acinetobacter*, undescribed genus of *Enterobacteriaceae*, *Weissella*, *Lactococcus*, *Enhydrobacter* and *Lactobacillus* (between 0.9% and 11.2% of the genera represented). Figure 4. Bacterial genera in raw milk from Hamdallaye and Kollo.

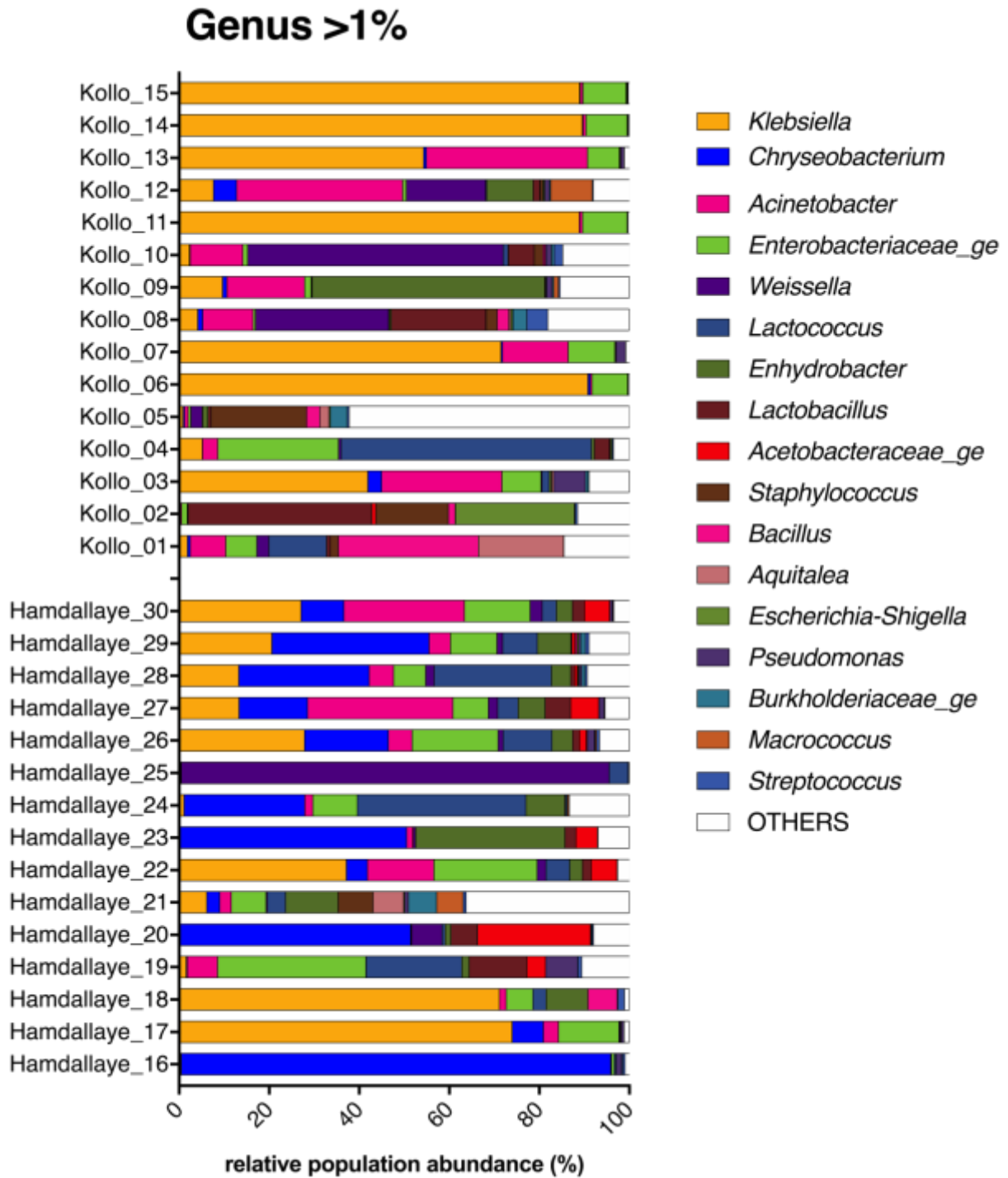


Figure 4: Bacterial genera in raw milk from Hamdallaye and Kollo.

The linear discriminant analysis (LDA) effect size (LEfSe), which suggests biomarkers explaining most of the effects differentiating phenotypes of interest, was then used to determine differentially abundant bacterial taxa between the Hamdallaye group and Kollo Group. Significant differences were observed (for all groups this was a = 0.05, LDA score > 3.0; Figure 3) for increases in *Acetobacteriaceae*, *Streptococcaceae*, *Moraxellaceae*, *Weeksellaceae* and *Chromobacteriaceae*

families in the Hamdallaye group as well as *Chromobacteriaceae* in the Kollo group. At the genus level, *Acinetobacter*, *Lactococcus*, *Chryseobacterium* and *Aquitalea* were statistically more abundant in the Hamdallaye than in Kollo, while the opposite was observed for *Aquitalea*. The effects differentiating phenotypes of interest, was then used to determine differentially abundant bacterial taxa between Hamdallaye and Kollo groups. Based on the Mann Whitney test, there is no significant difference between Hamdallaye and Kollo samples but there were trends for other taxa differences between the groups (Figure 5).

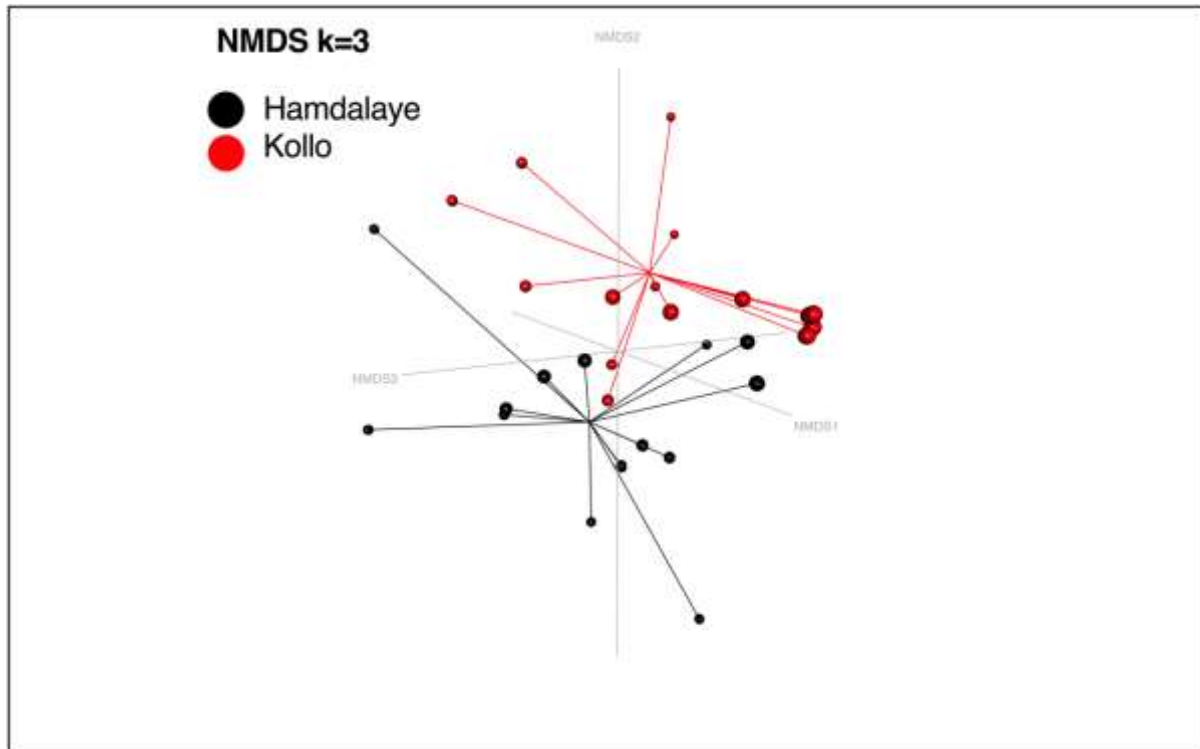


Figure 5. Principal coordinate analysis plots, based upon the Bray-Curtis dissimilarity matrix, of the two groups. No significant clustering ($P > 0.05$) was observed between the Hamdallaye and Kollo groups using AMOVA. (black, Hamdallaye; red, Kollo). $N=30$ (15:15 Hamdallaye and Kollo)

DISCUSSION

The conception of a collection centre must be based on a feasibility study analysing the technical, economic, social and institutional aspects. The presence of dairy industry makes the collection centre model very relevant in more rural areas in the Niamey dairy pool.

In this study, the level of bacterial counts (mean values expressed in log cfu/ml) at Hamdallaye (with values of 4.3 for TAC, 4.1 for coliforms and 3.3 for *E. coli*) was not significantly different from that in Kollo (4.2 for TAC, 3.6 for total coliforms and 4.2 for *E. coli*). The total

mesophilic bacteria and *E. coli* counts are respectively recognised as indicators of general hygiene and faecal contamination in foods (International Organization for Standardization, 2001; 2003).

In our study, the levels of hygiene indicator bacteria in raw milk were found to be relatively high. This could be attributed to a deficient milking process, a post milking contamination by environment and/or microbial multiplication. It is generally recognised that main enteric bacteria are destroyed at conventional pasteurisation temperatures (Niyonzima et al., 2016; Korsak et al., 2004; Jay et al., 2005). The determinants of the milk quality are the health of dairy herd, milking and pre-condition of storage (Farougou et al., 2011). Bacteria can enter the milk while it is still in the udder and the raw milk is contaminated from outer surface of udder, milking utensils and milkers (Chye et al., 2004, Farougou et al., 2011, Bonfoh et al., 2007). The mean TAC (4.3 log cfu/g) recorded in raw milk from Hamdallaye and Kollo collection centres was found to be lower than those recorded in other developing countries like the studies conducted in Burkina Faso (Sissao et al., 2015), in Togo (Seme et al., 2015) and in Djibouti (Mohamed et al., 2017) where it was shown that average total bacteria counts in raw milk were of 5.06, 5.77 and 6.78 log cfu/ml respectively.

As for hygiene indicator bacteria, concerning total coliforms a mean count of 7.6 log cfu/ml was recorded in the present study. The result of total coliforms in this study is higher compared to those observed in Benin by Farougou and collaborators in 2011 (2.9 log cfu/ml); in Togo by Seme et al. in 2015 (3.44 log cfu/ml); in Morocco by Abdelkrim et al. in 2008 (4.3 log cfu/ml), in Ethiopia by Welearegay et al. (2012) (4.9 log cfu/ml). For *E. coli*, the average count of 3.7 log cfu/ml our findings is comparable to that reported in raw milk by Singh and Shakar (2017) in India. However, lower counts were reported in Benin where *E. coli* loads as low as 0.6 log cfu/g were recorded in raw milk (Farougou et al. 2011); in Tunisia where a mean of 2.7 log cfu/ml were recorded in unpasteurized milk (Bali et al., 2013) and in France, where a mean *E. coli* load of 2.1 log cfu/g was observed in raw milk from different farms (Raynaud et heuchel, 2005).

In this study, we observed no statistically significant difference in microbial contamination between Hamdallaye and Kollo sites. Although there were no statistically significant differences for the microbiological parameters such as total aerobic count (TAC), total coliforms but the analyses revealed a significant of *E. coli* because the samples comes from a bulk milk and from different farms. However, our results need to be confirmed on a wider scale by taking more samples and by taking into account in our statistical analysis the hygiene practices during milking , the collection of bulk milk from several villages and transport of raw milk.

In relation to the metagenetic results, at the family level, the main findings of the present study were a higher abundance of Enterobacteriaceae, Moraxellaceae, Leuconostocaceae, Streptococcaceae and Lactobacillaceae in the raw milk samples from the Hamdallaye collection centre in comparison to

the Kollo collection centre which has a higher abundance of *Weeksellaceae*. *Enterobacteriaceae*, members of the Proteobacteria phylum, are mainly Gram-negative bacteria and are related to *Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, and *Citrobacter* genera (collectively called the coliform bacilli). In human beings, some types of *E. coli* can cause serious foodborne disease (Li et al., 2018) and mastitis in animals (Osman et al., 2014). Bacteria from the *Lactobacillales* family belong to the *Firmicutes* phylum. This phylum seems to be represented at a level higher than 60% in the fecal microbiota of cattle, while members of the *Lactobacillales* family make up to 19% of the raw milk bacterial population (Kim et al., 2017, Quigley et al., 2013). Therefore, *Lactobacillales* are considered as normal inhabitants of the bovine mammary gland and may be recovered in raw milk (Kim et al., 2017). These *Lactobacillales* can play an important role in dairy product manufacture; they may contribute to promoting human health or enhancing food safety. On the other hand, these microorganisms can lead to spoilage of milk by contrast to *Enterobacteriaceae* (Quigley et al., 2013). The *Firmicutes* with the families of *Leuconostocaceae*, *Streptococcaceae*, *Lactobacillaceae* and *Staphylococcaceae* are encountered more in the raw milk supports the hypothesis that different hygiene practices might be applied during both milking processes, although no difference in conventional microbial results was observed. The hypothesis of a difference in contamination levels between Hamadallaye and Kollo centres needs to be confirmed by more extensive research. Regardless of the sample variations from Hamdallaye and Kollo, consistent taxa were represented by 4 phyla with the phyla *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Actinobacteria*, and *Bacteroidetes* which are especially dominant. This result was similarly found in culture-based studies and many other countries (Li et al., 2018; Kim et al., 2017).

At the genus level, the lack of hygiene may be advanced in order to explain the increase of *Klebsiella* in the sample of Kollo centre in opposite to the Hamdallaye centre where *Chryseobacterium* are more abundant. The genus *Chryseobacterium* is a member of the family Flavobacteriaceae, phylum Bacteroidetes, and currently consists of 19 species, with *Chryseobacterium gleum* as the type species and the most species found in the milk sample of Hamdallaye were *Chryseobacterium haifense* a psychrotolerant bacteria found in raw milk (Hantsis-zacharov and Halpern, 2019). Six of the *Klebsiella oxytoca* isolates were mesophilic (optimum temperatures of 32.0 to 37.8°C) with two isolates having psychrotrophic tendencies (optimum temperature of 26.8°C). Although Gram negative bacteria like *Klebsiella* are regularly considered as indicators of poor hygiene and may constitute a health risk. *Klebsiella* reflects poor udder preparation, poor sanitation or deficiencies with respect to the hygiene of equipment (Quigley et al., 2013). *Klebsiella oxytoca* was significant in preliminary development of the ropy condition (Westhoff and Program, 1983). For *Acinetobacter*, Enterobacteriaceae group, *Weissella*, *Lactococcus*, *Enhydrobacter* and *Lactobacillus*, the situation was the same for the two collection centres. Bacteria from the genus *Acinetobacter* belong to the *Moraxellaceae* family and *Acinetobacter baumannii* is an opportunistic pathogen responsible for

nosocomial infections. However the origins of these bacteria remain unclear (Hamouda et al., 2011). These genera usually are originated from soil, teat, silage and environment (Quigley et al., 2013).

In relation to the bacterial diversity, richness and evenness, no statistical difference has been observed between Hamdallaye and Kollo collection centres. However, systematically, a higher level of bacteria was observed in the Hamdallaye collection centre in comparison to the Kollo collection centre. The number of OTUs observed in the samples of Hamdallaye centre is higher than in the samples of Kollo. This was also true regarding the diversity and the distribution that were more even in the Hamdallaye than in the kollo centre and the same observation has been done in classical microbiology according to the mean of TAC. For the present study, we chose to target the V1–V3 hypervariable region which is a longer target than the V3–V4 region and has therefore a better discriminating power for genus and species resolution. This choice was also based on the fact that the V1–V3 and V1–V4 regions are supposed to be more accurate to identify a larger array of bacteria without over or underestimating it too much. Moreover, the V1–V3 region is known to have a better discrimination regarding the *Klebsiella* genus from the sample of Kollo centre and *Chryseobacterium* from Hamdallaye collection centre samples, which make them pertinent in raw milk. In our study, beta-diversity was assessed with two different approaches. The first one evaluates the genetic diversity of the sequence reads population by building a phylogenetic tree and a UniFrac distance matrix. The second focuses on the taxonomic diversity in which a Bray–Curtis dissimilarity matrix is built upon a phylotype (Supplementary Table S 3). If the phylogenetic strategy assesses the genetic diversity as a whole, it is highly sensitive to sequencing errors, thus amplifying “noise.” The second strategy considers each category for the same taxonomic level on the same level and is usually used in ecological studies. Therefore, taxonomical analysis with Bray–Curtis seems more appropriate for the chosen sequencing region for this kind of microbial ecosystem. Finally, it is important to emphasize that this study also was performed on a limited dataset and should be confirmed by extended study (Ngo et al., 2018; Korsak et al., 2017).

The quality and safety of milk are an important issue in the dairy industry. Recently, some studies have evaluated the relationship between the milk microbiota and milk quality (Kim et al., 2017). In our study, there is no statistical difference between both classical and metagenetic studies (with the exception of some taxa) and in addition, even if it was not the main purpose of this study, by comparing our results with those of Li et al (2018) in China, the observed bacterial contaminations in raw milk could lead to food borne infection when the milk is consumed directly without heat treatment. It appears that environmental contamination through water seems to affect microbial spoilage population in food more than animal contamination. This work is a preliminary study. Therefore, we limited our comparison to the effects of hygiene during milking and the transport of raw milk to the collection centres. Finally, several parameters that may influence the bacterial

contamination in raw milk were not investigated in this work: the milking sequence, and the cleanliness of utensils and teat.

CONCLUSION

Despite its limitations due to a small sample size, this study has shown that the raw milk microbial communities from the Hamdallaye and Kollo collection centres in Niger is very contaminated by a diverse community of bacteria. These results could provide the crucial information for identifying and characterizing the microbiota in raw milk to ensure the reduction of spoilage and pathogenic bacteria for production of high quality dairy products. In comparison to culture-based methods on selective media and previous culture-independent techniques, metagenetic analysis combined with the enumeration of total flora provides more information on the potential sources and role of microorganisms, and its use should be considered as a technique for raw milk quality control. In other words, metagenetic analyses may elucidate the origins of raw milk contamination. Indeed, it may be useful to know the sources of contamination.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are indebted to Drs Issa Hamadou, Mamane Moutari Souley, and Moumouni Harouna for their cooperation and breeders for assistance in providing the samples of raw milk. This study was supported by the West Africa Agricultural Productivity Program Project (PPAAO/WAAPP)

REFERENCES

Bali OS, Lajnef R, Felfoul I, Hamadi A and Mohamed A. (2013). Detection of *Escherichia coli* in unpasteurized raw Milk. International Journal of Agriculture and Food Science,4:53-56. ISSN 2249-8516.

Bell C., Greenwood M., Hooker J., Kyriakides A., Rebecca M. (1997). Development and use of microbiological criteria for food. Food Science and Technology Today, 11, 137-176

Bonfoh B, Fokou G, Ould Taleb M, et al (2007) Dynamiques des systèmes de production laitière, risques et transformations socio-économiques au Mali. Revue Élev Méd vét Pays trop 60:67–76. doi: 10.1110/ps.051477905

Buehner KP, Anand S, Djira GD, Garcia A (2014). Corrigendum to “Prevalence of thermophilic bacteria and spores on 10 Midwest dairy farms”1. Journal of Dairy Science 97:8009–8016. doi: 10.3168/jds.2014-97-12-8009

Ceugniz A, Taminau B, Daube G, Drider D. (2016). Use of a metagenetic approach to monitor the bacterial microbiota of “Tomme d’Orchies” cheese during the ripening process. *International Journal of Food Microbiology*. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2016.10.034

Chye FY, Abdullah A, Ayob MK. (2004). Bacteriological quality and safety of raw milk in Malaysia. *Food Microbiology* 21:535–541. doi: 10.1016/j.fm.2003.11.007

Delcenserie V, Taminau B, Delhalle L, C. Nezer , P. Doyen ,S. Crevecoeur , D. Roussey ,N. Korsak , and G. Daube (2014). Microbiota characterization of a Belgian protected designation of origin cheese , Herve cheese , using metagenomic analysis. *J. Dairy Science*. 97 :1–11 doi: 10.3168/jds.2014-8225. American Dairy Science Association®, 2014.

Charlotte G. Neumann, Nimrod O. Bwibo, Suzanne P. Murphy, Marian Sigman, Shannon Whaley, Lindsay H. Allen, Donald Guthrie, Robert E. Weiss and Montague W. Demment.(2003). Animal source foods to improve micronutrient nutrition and human function in developing countries. *The Journal of Nutrition* 133:3875S–4061S. doi: 0022-3166/03

Food and Agriculture Organization (2014). Food outlook October 2014: Biannual report on global food markets. Food outlook: Biannual report on global food markets. doi: ISSN 1560-8182

Farougou S, Philippe S, Boko KC. (2012). Microbiological quality of raw milk processed from cows raised under extensive system in the republic of Benin. *Research Journal of Microbiology* 7(7):337-343,2012.

Ghafir Y, China B, Dierick K, L.de Zutter and G.Daube. (2008) Hygiene Indicator Microorganisms for Selected Pathogens on Beef, Pork, and Poultry Meats in Belgium. *Journal of Food Protection* 71:35–45. doi: 10.4315/0362-028X-71.1.35

Gopal N, Hill C, Ross PR, Tom PB, Mark A F and Paul D C. (2015). The prevalence and control of *Bacillus* and related spore-forming bacteria in the dairy industry. *Frontiers in Microbiology* 6:1–18. doi: 10.3389/fmicb.2015.01418

Hamouda A, Findlay J, Hassan L Al, Amyes SGB. (2011). Epidemiology of *Acinetobacter baumannii* of animal origin. *International Journal of Antimicrobial Agents* 38:314–318. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2011.06.007

Hantsis-zacharov E, Halpern M. (2007). *Chryseobacterium haifense* sp . nov ., a psychrotolerant bacterium isolated from raw milk. *International Journal of Systemic and Evolutionary Microbiology* (2007),57, 2344–2348. doi: 10.1099/ijs.0.65115-0

Huck JR, Hammond BH, Murphy SC, N. H. Woodcock, and K. J. Boor. (2007). Tracking Spore-Forming Bacterial Contaminants in Fluid Milk-Processing Systems. *Journal of Dairy Science* 90:4872–4883. doi: 10.3168/jds.2007-0196

Hutchison ML, Walters L.D., Sheryl M. A., Carol A, Douglas W., Mary H., Alexander M. J., and Sava B.(2005) A comparison of wet-dry swabbing and excision sampling methods for microbiological testing of bovine, porcine, and ovine carcasses at red meat slaughterhouses. *Journal of Food Protection* 68:2155–2162. doi: 10.4315/0362-028X-68.10.2155

International Commission on Microbiological Specification for Foods (ICMSF).(1986). *Microorganisms in Foods 2. Sampling for microbiological analysis: Principles and specific applications* 2nd Ed. International Commission on Microbiological Specifications for Foods, -278 p.

IDF, 1990. Handbook on milk collection in warm developing countries. *IDF Special issue* N°9002, Brussels (Belgium), pp. 1-148.

International Organization for Standardization (2005). *Microbiology of food and animal feeding stuffs Horizontal method for the detection and enumeration of presumptive *Escherichia coli** .Geneva ISO 7251:2005 pages 13.

International Organization for Standardization (2003). *Microbiology of food and animal feeding stuffs Horizontal method for the enumeration of microorganisms Colony- count technique at 30 °C* (Vol. 1). Geneva: International Organization for Standardization. ISO 4833:2003.

Julien MC, Dion P, Lafrenière C, Antoun H, and Drouin P. (2008). Sources of clostridia in raw milk on farms. *Applied and Environmental Microbiology* 74:6348–6357. doi: 10.1128/AEM.00913-08.

Kim IS, Hur YK, Kim EJ, Young-Tae Ahn YT , Kim JG, Yun-Jaie Choi YJ and Huh CS. (2017). Comparative analysis of the microbial communities in raw milk produced in different regions of Korea. *Asian Australasian Journal of Animal Science* 30:1643–1650.

Korsak N, Clinquart A, Daube G (2004). *Salmonella* spp . dans les denrées alimentaires d ' origine animale : un réel problème de santé publique ? *Ann.Méd.Vét.*,2004,148,174–193.

Korsak N, Taminiau B, Hupperts C, Delhalle L, Nezer C, Delcenserie V, and Daube G. (2017). Assessment of bacterial superficial contamination in classical or ritually slaughtered cattle using metagenetics and microbiological analysis. *International Journal of Food Microbiology* 247:79–86. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2016.10.013

LeJeune JT, Rajala-Schultz PJ .(2009). Unpasteurized Milk: A Continued Public Health Threat. *Clinical Infectious Diseases* 48:93–100. doi: 10.1086/595007

Li N, Wang Y, You C, Ren J, Chen W, Zheng H and Liu Z (2018). Variation in Raw Milk Microbiota Throughout 12 Months and the Impact of Weather Conditions. *Scientific Reports* 8:1–10. doi: 10.1038/s41598-018-20862-8

Mariama G, Philippe S, Serge A, Azokpota P, Youssao I, Farougou S and Gouro A S.(2017). Analyses of constraints related to milk production in Liptako Gourma in Niger. *African Journal of Agriculture Research* vol-12(23),pp1949-1958,8June2017. doi: 10.5897/AJAR2016.12029.

Mohamed AF, Mk Somda, AE Fourreh ,Okieh A A,Said CN,Mérito A and Yagi S. (2017). Evaluation of Microbiological Quality of Raw Milk from Farmers and Dairy Producers in Six Districts of Djibouti *Journal of Food : Microbiology , Safety & Hygiene*. doi: 10.4172/2476-2059.1000124

Newell DG, Koopmans M, Verhoef L, Duizer E , Kane AA , Sprong H, Opsteegh M, Langelaar M , Threfall J, Scheutz F , Giessen JVD and Kruse H. (2010). Food-borne diseases - The challenges of 20 years ago still persist while new ones continue to emerge. *International Journal of Food Microbiology* 139:S3–S15. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.01.021

Ngo J, Taminiau B, Fall PA, Daube G and Fontaine J. (2018). Ear canal microbiota – a comparison between healthy dogs and atopic dogs without clinical signs of otitis externa. *Veterinary Dermatology* 29:425-e140. doi: 10.1111/vde.12674

Niyonzima E, Ongol MP, Brostaux Y, Koulagenko N K, Daube G , Kimonyo A and Sindic M. (2016). Daily intake and bacteriological quality of meat consumed in the households of Kigali, Rwanda. *Food Control* 69:108–114. doi: 10.1016/j.foodcont.2016.04.042

Osman KM, Hassan HM, Orabi A, Abdelhafez AST (2014). Phenotypic , antimicrobial susceptibility profile and virulence factors of *Klebsiella pneumoniae* isolated from buffalo and cow mastitic milk. *Pathogens and Global health*.2014 vol 108 N°04,191–199. doi: 10.1179/2047773214Y.0000000141

Quigley L, O’Sullivan O, Stanton C, Beresford TP, Ross RP, Fitzgerald GF and Cotter PD. (2013). The complex microbiota of raw milk. *FEMS Microbiology Reviews* 37:664–698. doi: 10.1111/1574-6976.12030

Raats D, Offek M, Minz D, Halpern M (2011). Molecular analysis of bacterial communities in raw cow milk and the impact of refrigeration on its structure and dynamics. *Food Microbiology*

28:465–471. doi: 10.1016/j.fm.2010.10.009

Seme K, Pitala W, Osseyi GE (2015). Qualité Nutritionnelle Et Hygiénique De Laites Crus De Vaches Allaitantes Dans La Région Maritime Au Sud-Togo. *European Scientific Journal* December 11:359–376.

Singh AK, Shankar U (2017). Microbiological Study of Raw Milk Collected from Local Milk Vendors of Lucknow District , UP , India. *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci* (2017) 6(5):2866–2873. ISSN: 2319-7706

Sissao M, Millogo V, Ouedraogo A (2015). Composition chimique et qualité bactériologique des laités crus et pasteurisés au Burkina Faso. *Afrique SCIENCE*. 11(1) (2015):142–154.

Stevens A, Kaboré Y, Perrier-Gros-Claude JD, Millemann Y, Brisabois A, Catteau M , Cavin JF and Dufour B (2006). Prevalence and antibiotic-resistance of *Salmonella* isolated from beef sampled from the slaughterhouse and from retailers in Dakar (Senegal). *International Journal of Food Microbiology* 110:178–186. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2006.04.018

Vias G, Marichatou H, Kore H, (2005). Synthèse bibliographique sur la filière laitière au Niger. Réseau de Recherche et d'Échanges sur les Politiques laitières (www.Repol.sn.) page 40

Welearegay H, Yilma Z, Tekle-Giorgis Y (2012). Hygienic practices and microbiological quality of raw milk produced under different farm size in Hawassa, southern Ethiopia. *Agricultural Research and Reviews* 1:132–142. doi: 10.1007/s11250-008-9275-6

Westhoff DC and Cheung BA (1983). Isolation and Identification of Ropy Bacteria in Raw Milk. *Journal of Dairy Science* vol 66, N°9, (1983) 1825–1834. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(83)82020-

Discussion - Perspective

DISCUSSION GENERALE

Après la présentation des études expérimentales dans la section II, une discussion générale de résultats obtenus fait l'objet d'une présentation dans la section IV. Cette section est regroupée en un chapitre qui donne un aperçu des principales conclusions de cette recherche ainsi que les implications pratiques et les limites de cette étude.

Qualité microbiologique et chimique du lait cru de vache dans le bassin laitier de Niamey (Niger)

Recherche des résidus dans le lait cru

Au Niger, la production laitière et de viande est soumise à plusieurs pratiques dont l'usage des médicaments vétérinaires en élevage des animaux domestiques. Parmi ces produits, se retrouvent en ligne de mire les antibiotiques. Dans la zone d'étude où des éleveurs locaux étaient questionnés, deux (02) familles d'antibiotiques étaient utilisées en élevage de bovins. Il s'agit des tétracyclines et des bêta-lactames. Une étude a rapporté que ces deux groupes d'antibiotiques étaient également retrouvés dans la région de Maradi et utilisés par les éleveurs de bovins (Soumaila, 2016). L'utilisation des antibiotiques dans la zone d'étude était variable selon les éleveurs, avec une utilisation à 47 % à titre préventif et curatif, à 29 % curatif et 12 % à titre préventif et aussi, en absence de la chaîne de froid, les collecteurs peuvent rajouter des antibiotiques dans les bidons de lait avant le transport pour éviter le rejet au niveau des centres de collectes. Ces pratiques favorisent une contamination de la chaîne alimentaire par des résidus d'antibiotiques, comme le confirment les résultats de détection des résidus d'antibiotique dans le lait cru de vache prélevé au niveau des 6 sites de prélèvements du bassin laitier de Niamey à l'aide d'un test biologique standardisé sous forme de kit, le Delvotest[®]. La présence de résidus dans le lait et les autres denrées d'origine animale est due à une mauvaise utilisation des antibiotiques par les éleveurs et les agents de santé, ainsi qu'à un non-respect des délais d'attente après traitement des animaux. Notre étude révèle que sur les 192 échantillons analysés, 19 (soit 9,9 %), contenaient des résidus d'antibiotiques. La contamination des denrées d'origine animale par les résidus d'antibiotiques a pour origine l'utilisation en grande majorité des tétracyclines à cause de son spectre d'action assez large contre beaucoup de bactéries Gram négatives et même positives (Dognon, 2018). En effet, les tétracyclines étaient utilisées par tous les éleveurs de la zone d'étude. Grâce à l'utilisation du test qualitatif Premi[®]Test, Soumaila (2016) a confirmé que 96 % des éleveurs de la région de Maradi (Niger) utilisent les tétracyclines comme antibiotiques et le test qualitatif Premi[®]Test a montré un résultat positif de 44,6 %. Les familles d'antibiotiques utilisées en médecine vétérinaire sont les mêmes que celles utilisées en santé humaine (Mensah et al., 2014b ; Dognon, 2018).

La présence de résidus d'antibiotiques dans les denrées alimentaires d'origine animale est un facteur du développement de résistance antimicrobienne non seulement dans l'environnement mais aussi et surtout chez l'homme. Par exemple, les tétracyclines qui sont majoritairement utilisées dans la présente étude sont responsables de résistance développée par plusieurs bactéries (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella spp.*, *Enterobacter spp.*, *Proteus spp.*, etc.) isolées des hommes ayant été traités par ces médicaments (Chopra and Roberts, 2001, Dognon, 2018).

La résistance aux antimicrobiens (RAM) menace la prévention et le traitement efficace de quelques infections causées par les bactéries, les parasites, les virus et les champignons. La RAM est une menace de plus en plus grave pour la santé publique mondiale qui nécessite des actions de riposte rapides (OMS, 2018). D'après l'OMS (2018), la résistance aux antibiotiques se produit naturellement, mais une mauvaise utilisation des antibiotiques accélère le processus. Elle atteint des niveaux dangereusement élevés dans toutes les régions du monde. De nouveaux mécanismes de résistance apparaissent et se répandent en influençant notre capacité à traiter les maladies comme les maladies d'origine alimentaire. Au Niger, il a été aussi question de la mise en place d'un comité de suivi de la résistance aux antimicrobiens conformément aux recommandations de l'OMS pour la surveillance de la RAM mais lorsque des antibiotiques peuvent être achetés sans ordonnance pour un usage humain ou animal, l'émergence et la propagation de la résistance sont aggravées. Le manque de directive et de législation par rapport à l'utilisation des antibiotiques et des médicaments vétérinaires d'une manière générale, sans oublier le développement du secteur informel de ventes sont les principaux facteurs favorisant le développement de la résistance. Dans le monde, d'après une étude d'ECDC (European Centre for disease Prevention and Control) environ 33.000 personnes décèderaient chaque année à cause des RAM (ECDC, 2018).

L'hypothèse sur le nombre des morts fait peur mais pour endiguer la situation de la RAM, il faut accentuer sur le renforcement des capacités de gestion de la RAM à travers l'élaboration des politiques et/ou directives nationales et surtout l'intégration de la RAM dans les activités de formation et suivi-évaluation.

Qualité hygiénique du lait cru

En Afrique de l'Ouest, le sous-secteur de l'élevage est de plus en plus confronté à de graves difficultés, notamment la persistance de certaines maladies animales, la faible productivité des animaux et l'insignifiance des investissements tant publics que privés. Au Niger, l'un des grands défis de l'élevage, en général, et de la filière de production laitière, en particulier, est la persistance de maladies infectieuses et parasitaires qui ont un impact négatif sur la qualité de la production laitière. Les travaux sur la qualité microbiologique du lait au Niger sont très rares. Parmi ces travaux, on distingue une première étude intitulée « *contribution à l'étude de la qualité du lait caillé du Niger* »

conduite par Djibril en 1996 qui est une thèse de doctorat en médecine vétérinaire, puis une thèse intitulée « *Bilan bactériologique des mammites dans les troupeaux Zébu Azawak à la station expérimentale sahélienne de Toukounous (Niger) et épidémiologie moléculaire des Staphylococcus aureus isolés entre 2009 et 2012* » conduite par Ibrahim en 2015. Ces 2 dernières études sont les seules références actuellement disponibles sur ce sujet. La première étude a montré la prédominance des flores d'altération sur les pathogènes. Par ordre de fréquence, les levures viennent en tête (92,16 %) suivies de coliformes totaux (38,24 %), moisissures (32,35) et ASR (32,35). Les *Salmonella* étaient absentes dans tous les échantillons. En ce qui concerne la deuxième étude, les résultats ont montré que les mammites bovines sévissent essentiellement sous forme sub-clinique à la station sahélienne de Toukounous. Elles sont surtout causées par le genre *Staphylococcus* (espèce *S. aureus*), qui sont les bactéries mammopathogènes les plus fréquemment identifiées.

La présente étude rentre dans le cadre de cet axe et a pour objectif de mettre en évidence la qualité hygiénique du lait au niveau de 3 centres de collecte (Hamdallaye, Kollo et Say) et au niveau de 3 fermes laitières (Toukounous, Kirkissoye et Niamey périphérie) dans un but de mieux connaître la qualité microbiologique du lait cru destiné à la consommation humaine et, par la suite, dans un avenir à moyen terme, de réduire le risque d'intoxication alimentaire ou de contamination chimique du consommateur. L'étude s'est déroulée dans le bassin laitier de la ville de Niamey au niveau de 6 sites : Toukounous, Hamdallaye, Niamey, Kirkissoye, Kollo et Say, entre juillet 2015 et février 2017. Au total, 384 échantillons aléatoires (soit 64 échantillons par site) de lait cru de mélange ont été prélevés de façon aseptique dans les 3 centres de collecte (Say, Kollo et Hamdallaye) et les 3 fermes d'exploitations bovines (Toukounous, Niamey et Kirkissoye) selon les méthodes standards (ICMSF 1986; IDF 1990 ; Bell et al. 1997). Le plan d'échantillonnage et l'analyse des conditions d'hygiène ont été mis en œuvre conformément aux prescriptions de l'ICMSF (1986) et du *Codex alimentarius* (FAO et OMS 2007). Les analyses bactériologiques de tous les échantillons de lait ont été réalisées au Laboratoire Central de l'Élevage (LABOCEL) de Niamey. Les échantillons analysés sont fortement contaminés à tous les niveaux de sites avec une moyenne de 3,8 log ufc/ml \pm 0,54 pour les coliformes totaux, 3,6 log ufc /ml \pm 0,51 pour les *Escherichia coli* et 4,0 log ufc/ml \pm 0,48 pour *Staphylococcus* à coagulase positive.

La qualité bactériologique a permis de prouver que les résultats obtenus indiquent une forte contamination en coliformes totaux, *Escherichia coli* et *Staphylococcus* à coagulase positive. Cette contamination est sans doute liée au manque d'hygiène lors de la traite, à la contamination des ustensiles utilisés pour la traite, aux conditions de transport du lait à partir des villages jusqu'aux centres de collectes et à la multitude de transvasements du lait de plusieurs éleveurs par les collecteurs. Seme et al. (2015) ont rapporté que les différents degrés de contamination des échantillons ont un impact très important sur la qualité microbiologique du lait cru surtout au niveau de la conservation

mais également au niveau de la transformation. La présence de coliformes totaux en grand nombre n'indique pas forcément une contamination fécale du lait, mais elle peut être considérée comme un indicateur de mauvaise pratique sanitaire, d'une part, et une contamination de l'environnement, d'autre part (Farougou et al. 2011). L'étude sur les microorganismes indicateurs de la contamination d'origine fécale permet de juger de l'état hygiénique du lait cru. Ils témoignent des conditions hygiéniques dégradées lors de la traite même à des niveaux très faible. Ces résultats sont supérieurs et meilleurs comme illustrés dans le tableau 1.

Tableau 1 : niveaux de contamination du lait par les coliformes et *E. coli* dans différents pays africains

Pays	Coliformes totaux (log ufc/ml)	<i>E.coli</i> (log ufc/ml)	Références
Bénin	2,9	0,6	Farougou et al., 2011
Burkina Faso	ND	4,9	Marietou Sissao et al., 2015
Togo	3,44	ND	Seme et al., 2015
Djibouti	3,9	2,6	Mohamed et al., 2017
Ethiopie	2,5	ND	Haile et al., 2012
Maroc	6,2	ND	Ounine et al., 2004
Maroc	4.3	ND	Afif et al., 2008

ND : non déterminés

Les *Staphylococcus* à coagulase positive sont présents dans les échantillons de lait dans une proportion très élevée tant au niveau des fermes que des centres de collecte. La ferme de Niamey a une charge bactérienne significativement inférieure par rapport aux centres de collecte de Hamdallaye et de Kollo ainsi que par rapport à la ferme de Kirkissoye mais la charge bactérienne au niveau de la ferme de Toukounous est significativement inférieure par rapport à la ferme de Niamey. La ferme de Niamey est encadrée par une organisation non gouvernementale (ONG) du Niger dans le cadre de la redynamisation de la filière laitière. Cette ONG a instauré le rejet des premiers jets de lait, le lavage des ustensiles de la traite et du transport mais nous avons constaté que le lavage des mains n'était pas systématique. Ces *Staphylococcus* sont considérés comme agent causal des mammites cliniques et subcliniques en élevage bovin (Ibrahim 2015).

Une toxi-infection alimentaire collective (TIAC) est définie comme l'apparition chez au moins deux cas groupés, d'une symptomatologie similaire, le plus souvent de type gastro-intestinal dont on peut rapporter la cause à une même origine alimentaire. Aucun cas n'a été rapporté officiellement au Niger ; ceci est à mettre en relation avec le fait qu'il n'existe aucun système de surveillance. Il

convient toutefois de rester vigilant car le risque de contamination des aliments peut survenir à n'importe quelle étape du processus alimentaire, de la fourche à la fourchette, et, à cet égard, si les TIAC sont généralement bénignes, le caractère épidémique de ces dernières peut avoir un impact non négligeable en termes de santé publique (Niyonzima, 2017).

Limites des études menées dans cette thèse

Les travaux d'enquêtes portant sur les types des antibiotiques et leur mode d'utilisation en élevage bovin dans la zone d'étude, ont été réalisés sur un nombre limité d'éleveurs et une seule fois sur une courte période. Ceci n'a pas permis de mettre en évidence la période exacte de l'utilisation abusive des antibiotiques par les éleveurs de bovins. D'autres études futures sont indispensables pour apporter des réponses à ces questions.

Pour les travaux de détection de résidus d'antibiotiques dans le lait cru, notre étude s'étant déroulée pendant l'hivernage (4 mois sur 12 au Niger), il aurait été intéressant de réaliser une étude avec un échantillonnage plus étalé sur toute l'année, les pratiques d'élevage n'étant pas identiques d'une saison à une autre.

Le Delvotest doit avoir des limites de détection suffisamment basses (inférieures aux LMR ou aux niveaux minimum de performance requise). Un inconvénient majeur du Delvotest® T est qu'il ne permet pas l'identification de la molécule et encore moins d'avoir une estimation de sa concentration. Pour avoir une idée des types d'antibiotiques utilisés, nous devrions confirmer nos résultats positifs à l'aide d'une méthode de détection et de quantification des antibiotiques (ex : HPLC) (Scippo et al., 2006).

Evaluer de manière exhaustive les flores microbiennes des laits crus de vache avec les moyens actuels est quasi impossible. Les méthodes actuelles permettent d'évaluer les flores microbiennes dominantes des laits crus et présentent des avantages et des inconvénients. Les méthodes dites « cultures-dépendantes » permettent d'évaluer la flore microbienne cultivable. L'information obtenue par cultures et dénombrements sur milieux plus ou moins spécifiques se limite à la quantification d'un groupe de microorganismes ou d'un genre donné et parfois d'une espèce (cas des bactéries pathogènes, par exemple). Dans notre étude, il est souhaitable d'élargir à d'autres bactéries pathogènes comme les *Brucella* et *Mycobacterium* comme l'atteste l'étude de Boukary (2013) qui confirme la présence de la brucellose et de la tuberculose bovine dans tous les systèmes de production animale au Niger. Pour approfondir la description des communautés microbiennes, les dénombrements peuvent être complétés par une caractérisation phénotypique et moléculaire des isolats sur un nombre élevé de fermes.

Biodiversité microbienne du lait cru à travers la métagénomique

Au Niger, comme dans la plupart des autres pays de l'Afrique au sud du Sahara, le lait est un aliment stratégique pour l'apport en protéines. A côté de son importance nutritionnelle, le lait représente également une source de revenus assez importante pour les producteurs. Pour les éleveurs, la valorisation du lait a toujours représenté une importante source de revenus. Il est à la fois, une ressource, un produit à valeur d'usage et d'échange, un objectif de production animale et enfin une référence culturelle (FAO, 2017). Le gouvernement du Niger reconnaît bien l'importance de l'élevage puisqu'il a créé un ministère de l'élevage. L'élevage contribue à 35 % du PIB agricole, avec un effectif global de 42 millions têtes, toutes espèces confondues avec 66 % des éleveurs sédentaires, 18 % des nomades et 15,40 % d'éleveurs transhumants (INS, 2004). Dans ce contexte nouveau, les enjeux pour les filières agricoles africaines sont d'accroître leur compétitivité, c'est-à-dire la capacité d'acquérir des parts de marchés. Ces enjeux passent par une politique de prix et une maîtrise de la qualité sanitaire et microbiologique. Ce travail s'inscrit dans le cadre de la maîtrise de la qualité sur la filière laitière au niveau de 3 fermes et 3 centres de collecte dans le bassin laitier situé autour de la ville de Niamey. Le choix de la filière laitière se justifie par l'importance économique que revêt cette activité pour les ménages (petits producteurs périurbains, collecteurs), les unités de transformation de plus en plus nombreuses et l'Etat. L'analyse métagénomique du lait cru permet la description de l'ensemble de la population microbienne présente au sein de l'échantillon et fournit une vision quasi exhaustive des populations microbiennes majoritaires. L'analyse de la dominance, de la richesse et de l'homogénéité des populations bactériennes nous a montré que le lait échantillonné à Kirkissoye avait une richesse bactérienne significativement plus élevée que Niamey et Toukounous tandis qu'il n'y avait pas de différence significative entre les laits prélevés à Kollo, Say et Hamdallaye. Les bactéries retrouvées dans le lait cru et à la surface des trayons de vache constituent la plus grande diversité de groupes microbiens en comparaison avec ce que peut apporter l'environnement ou les trayeurs. (Michel et al., 2005 ; Tormo, 2010; Braem *et al.*, 2012 ; Monsallier *et al.*, 2012 ; Verdier-Metz *et al.*, 2012).

Quatre classes de micro-organismes ont été retrouvées à savoir des genres qui facilitent la fermentation laitière, causent la détérioration, favorisent la santé et enfin qui causent des maladies. Il faut reconnaître que peu d'études portant sur la métagénomique du lait cru ont été menées, si bien qu'il est difficile de comparer nos résultats à ceux de la littérature. On peut toutefois citer deux études menées en Chine et en Corée du sud où l'identification de la biodiversité bactérienne à travers la métagénomique a permis d'identifier les bactéries utiles et les bactéries altérantes et leur variation en fonction des saisons (Li et al., 2018 ; Kim et al., 2017).

Microorganismes ayant un intérêt technologique

Parmi les microflores dénombrées sous-dominantes, les bactéries lactiques mésophiles ainsi que les microcoques et corynébactéries considérées comme ayant un intérêt technologique en transformation fromagère sont détectées dans la majorité des laits crus. *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus* et *Enterococcus* sont les genres les plus fréquemment détectés à travers les analyses de la microbiologie classique et les technologies de séquençage de nouvelle génération (NGS) (Delbes et al., 2007 ; Quigley et al., 2013 ; Kim et al., 2017 ; Li et al., 2018). Si l'on compare nos résultats à ceux obtenus sur les fromages à base de lait cru de vache, on observe la même tendance : *Lactococcus lactis*, *Enterococcus* spp. et *Leuconostoc* spp. sont les bactéries lactiques les plus fréquemment rencontrées (Delcenserie et al., 2014 ; Ceugnez et al., 2015). Les bactéries lactiques sont réputées sans danger pour l'homme et jouent un rôle inhibiteur de la croissance des bactéries potentiellement pathogènes dans le lait cru. Cependant, elles provoquent aussi la dégradation du lait quand ce dernier n'est pas conservé à la température de réfrigération (Afsca, 2015). Dans notre étude, la chaîne de froid est absente jusqu'à la livraison au centre de collecte et au client, nous pouvons confirmer que le lait de notre étude se dégrade très vite à cause des facteurs précités mais aussi suite aux conditions climatiques.

Microorganismes favorisant l'altération du lait cru

Des genres ont également été identifiés dans certains des échantillons au niveau de la présente étude, tels que *Moraxella*, *Weissella*, *Vogesella*, *Acinetobacter*, *Chryseobacterium* et *Kocuria*. Les bactéries du genre *Vogessella*, similaire au *Pseudomonas*, sont habituellement classées comme indésirables (altérantes). Neanmoins *Bacillus* et *Pseudomonas* sont plus présents et interviennent plus dans l'altération lorsque le lait est stocké à basse température (Champagne et al., 1994 ; Li et al., 2018). Le genre *Pseudomonas* est le plus abondant pendant la réfrigération et les espèces les plus couramment rencontrées sont *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas gessardii*, *Pseudomonas fragi* et *Pseudomonas lundensis* (Mallet et al., 2012). Toutes ces bactéries ont été décrites dans notre étude mais cette hypothèse de la présence des bactéries altérantes sera vérifiée à travers une étude ultérieure sur leurs mécanismes de développement dans le lait.

Microorganismes ayant un impact positif sur la santé des consommateurs

Outre son bon goût, le lait cru présente de multiples avantages pour la santé. Les genres *Pseudomonas*, *Propionibacterium*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* révélés dans notre étude, sont considérés comme des probiotiques dans le lait cru (AFSCA, 2015). Ils contribuent à la santé intestinale, et donc à la santé globale de l'être humain. Ils protègent contre la dysbiose intestinale, source d'une multitude de problèmes de santé, et peuvent inhiber la croissance des bactéries

pathogènes allant jusqu'à protéger contre certaines maladies comme la pneumonie. Ces bactéries doivent être ingérées dans des quantités qui sont 1.000 à 10.000 fois plus élevées que celles réellement présentes dans le lait cru dans l'optique de jouer son rôle bénéfique (AFSCA, 2015). Les Bifidobactéries ont été retrouvées dans le lait cru ainsi que dans les produits laitiers à base de lait cru (Delcenserie et al., 2015 ; Kim et al., 2017 ; Li et al., 2018). Ruaro et collaborateurs (2012) ont montré que certaines bactéries présentent des gènes d'activité d'antibiorésistance et ce qui nous oblige à vérifier cette activité d'antibiorésistance par des études approfondies sur la sécurité des probiotiques. On peut ajouter que la présence des genres indésirables peut être liée aux conditions de traite, à l'hygiène de la traite et à l'environnement de la traite.

Microorganismes pathogènes pour l'homme et les animaux

Le risque d'intoxication alimentaire reste une menace dans de nombreuses régions du monde, la contamination microbiologique étant l'un des problèmes majeurs. Il est reconnu que les agents pathogènes d'origine alimentaire représentent un risque grave pour la santé, le risque dépendant principalement du type d'aliment et de la quantité consommée (OMS, 2015 ; Denayer et al., 2016).

L'état sanitaire du troupeau influencerait également les équilibres microbiens du lait. L'absence de suivi du troupeau par le contrôle laitier augmente le risque de présence des staphylocoques. Les staphylocoques font partie de la flore cutanée normale des animaux et des humains. Ce sont les germes les plus fréquemment impliqués dans les mammites cliniques et sub-cliniques chez les vaches laitières (Issa, 2015). *Staphylococcus aureus* est un micro-organisme pathogène parmi les plus souvent incriminés dans des cas de toxi-infections d'origine alimentaire collectives (TIAC) par le lait et les produits laitiers chez l'homme. L'intoxication résulte de l'ingestion d'entérotoxines staphylococciques (SE) produites dans les aliments par des souches de *S. aureus* productrices de SE (Derzelle et al., 2009 ; Carfora et al., 2015).

Parmi les *Streptococcus*, nous avons identifié des OTU de *Streptococcus* taxonomiquement proches des *Streptococcus agalactiae*, agent causal de mammites chez la vache laitière (Trijbel-Smeulders et al., 2003 ; Zadoks et al., 2004 ; Chiang et al., 2008) mais aussi de septicémie, de méningite et de pneumonie chez les humains, surtout chez les nouveau-nés (Kouamé-Sina., 2013).

Acinetobacter, *Enhydrobacter*, *Aeromonas* et *Brevundimonas* sont des genres bactériens fréquemment isolés dans l'eau et l'environnement (Vaz-Moreira et al., 2017, Li et al., 2018). On peut dire que les genres liés à l'eau sont des sources de contamination du lait cru et qui entraînent une dégradation rapide du lait (Li et al., 2018). *Aeromonas*, *Chryseobacterium* et *Stenotrophomonas* sont des pathogènes opportunistes causant des maladies chez l'homme (Ohnishi et al., 2012; Stratev et Odeyemi, 2016). *Acinetobacter* était le principal genre dans tous les échantillons de lait cru analysés.

Ce genre peut réduire la durée de conservation de certains produits à cause de la production des lipases et protéases, généralement thermostables, à l'origine de défauts de goût (rance, amertume) et certaines peuvent être à l'origine de défauts de pigmentation ou d'aspect poisseux (De Filippis et al., 2013; Korsak et al., 2015). Il est résistant à certains antimicrobiens, ce qui nous amène à clairement examiner le lait cru non seulement pour les pathogènes d'origine alimentaire mais aussi pour *Acinetobacter*, qui pourrait présenter un risque pour la santé publique étant donné son activité d'antibiorésistance (Gurung et al., 2002).

Dans notre étude, la contamination par le genre *Enhydrobacter* peut être liée à l'utilisation de l'eau de puit ou des marigots pour le lavage des ustensiles et l'abreuvement des animaux. On peut dire que les conditions de traite, l'hygiène à la traite et le lavage des mains de trayeurs influenceraient les niveaux des flores microbiennes et les équilibres entre espèces bactériennes.

Effet de la saison sur les niveaux des microflores des laits crus

Nous avons comparé les deux études réalisées sur la biodiversité microbienne dans deux périodes différentes à savoir janvier et août. La structure au niveau de phyla des communautés bactériennes détectées n'a aucun effet de saison (figure 1) d'un point de vue statistique de la moyenne générale de la fréquence relative des abondances bactériennes des sites. Nous avons constaté la domination des *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Actinobacteria*. Il y'a une différence de genres entre les prélèvements du mois d'août qui montraient une dominance de *Klebsiella*, *Chryseobacterium* et *Acinetobacter* par rapport aux prélèvements du mois de janvier qui étaient plus abondants en *Acinetobacter* suivi de *Staphylococcus* et *Escherichia* en plus de *Shigella*. Il faut reconnaître que le mois d'août se situe dans la saison pluvieuse pendant laquelle les genres altérants et pathogènes se développent plus facilement.

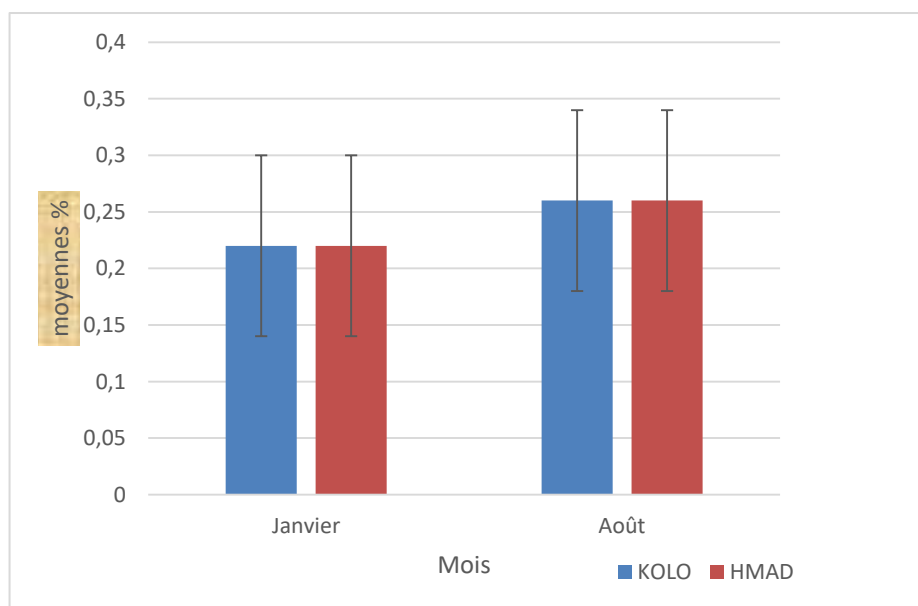


Figure 1 : effet des saisons sur la flore microbienne en fonction des moyennes

L'absence d'effet saison sur le genre *Acinetobacter* a été confirmé en Chine par Li et al., (2018) qui ont observé que ce genre était présent durant toute l'année. L'hypothèse d'un effet saison sur les autres genres devrait être développée dans une étude ultérieure durant toute l'année au Niger.

Limites de la métagénomique

La métagénomique est un outil important et ayant un potentiel d'utilisation très élevé pour ces technologies dans le domaine de la microbiologie alimentaire car elle permet de comprendre le microbiote analysé (Kergourlay et al., 2015).

Une de ces limites est constituée par le fait que cette approche apparaît comme étant purement descriptive (Siegwald, 2017). Pour Siegwald qui prend l'angle bioinformatique, ces descriptions ne sont en effet pas suffisantes pour comprendre le fonctionnement et les variations des microbiotes étudiés. On peut juste dire que la biodiversité de la flore peut être un élément facilitant l'interprétation de données cliniques, mais elle ne peut pas à elle seule expliquer l'étiologie d'une maladie, ne sachant si ce profil est une cause ou une conséquence de la condition évaluée. Dans notre étude, nous pouvons dire que la limite principale de la métagénomique est la non quantification des bactéries pathogènes présentes. La microbiologie classique est mieux indiquée pour étudier les flores pathogènes. L'approche métagénomique est la sélection d'un *locus* cible suffisamment discriminant entre les organismes d'intérêt, la courte taille des lectures de séquençage (< 500 nt (taille moyenne de lecture)) est limitée. Enfin il faut reconnaître que l'analyse métagénomique n'a pas de méthode standard normalisée mais on peut se baser sur le dénombrement des germes totaux et les résultats obtenus seront validés par qPCR (Cauchie et al., 2016).

Perspectives

Utilisation des médicaments antibiotiques en élevage de bovin suivant les saisons

L'objectif de cette étude sera d'évaluer l'effet des saisons sur l'utilisation des différents antibiotiques dans les élevages au Niger. Il s'agira d'une étude comparative qui fera ressortir l'influence des saisons pluvieuses et saisons sèches sur la prédominance des pathologies suivant lesquelles les antibiotiques sont utilisés. L'effet de la transhumance sur les pratiques d'utilisation des antibiotiques dans les élevages de bovins pourrait être aussi évalué à travers cette étude. Le Delvotest, qui est une méthode de screening utilisée dans cette étude mériterait d'être complété par un test quantitatif pour la détermination exacte de la quantité d'antibiotiques utilisés qu'on retrouve dans les denrées alimentaires d'origine animale.

La flore microbienne du lait

Pour comprendre les flux microbiens structurels et fonctionnels des environnements de la production laitière, il serait bon de mener une étude sur toute la durée de l'année afin d'étudier l'effet et d'élargir le champ d'échantillonnage.

Evaluation du risque pour le consommateur lié à son exposition aux résidus des antibiotiques et les bactéries pathogènes retrouvés dans le lait cru.

Des études complémentaires tant au niveau vétérinaire qu'au niveau humain doivent être menées pour avoir une idée correcte de la situation concernant les TIAC. Ces données devraient permettre de convaincre les autorités compétentes de l'importance d'adopter un plan de surveillance continue et de l'application de plans HACCP au niveau des élevages pour améliorer la qualité microbiologique des produits et donc protéger la santé publique.

Plans de surveillance, de contrôle de l'hygiène du lait

Les autorités doivent mettre en place un comité d'élaboration des normes et de réglementations relatives à l'hygiène, à la qualité et au contrôle du lait cru. Les autorités et les responsables des filières pourraient, à ce titre, s'inspirer du guide de bonne pratique d'hygiène de la production laitière au Sénégal en tenant compte de la législation européenne et des textes du *Codex Alimentarius* (Ministère de l'Élevage Sénégal, 2005).

Conclusions

Les objectifs scientifiques de cette thèse ont été de mettre en évidence la qualité hygiénique et chimique du lait cru et d'évaluer la biodiversité microbienne du lait cru au Niger au niveau de trois fermes (Toukounous, Niamey et Kirkissoye) et de trois centres de collecte (Hamdallaye, Kollo et Say).

Nos résultats confirment par ailleurs les connaissances sur les microorganismes indicateurs d'hygiène et la flore microbienne des laits crus, et apportent des connaissances originales grâce aux nouvelles méthodes de caractérisation des écosystèmes microbiens.

Le mécanisme d'identification bactérienne à travers la métagénomique est basé sur l'extraction d'ADN qui peut provenir des bactéries vivantes ou mortes. Les séquences taxonomiquement instructives, telles que la séquence de l'ARNr 16S est toujours utilisé dans le cadre de la détermination de la biodiversité microbienne.

Au vu de ces résultats, nous pouvons dire que le lait cru issu de la zone d'étude peut présenter un risque pour la santé.

Il convient alors de formuler les recommandations suivantes :

(i) A l'endroit des chercheurs : mobiliser les ressources nécessaires à la mise en œuvre des axes de recherche énumérés dans la partie perspectives de cette thèse. La réalisation de l'ensemble des études suggérées permettra de répondre à de nombreuses questions de recherche afin d'améliorer l'hygiène.

(ii) A l'endroit des décideurs politiques: Renforcer le cadre législatif par de nouvelles lois afin de mieux réglementer le secteur de l'élevage et de la transformation agro-alimentaire à travers la création d'une agence de régulation de la qualité sanitaire des aliments. Ils sont appelés à adopter des textes de lois fixant des limites maximales de résidus et la réglementation du marché pour les antibiotiques utilisés dans l'élevage. En vue d'une amélioration de la qualité des produits laitiers au Niger, des critères microbiologiques du lait devraient être définis. Faire bouillir le lait avant consommation est la seule mesure simple et efficace pour prévenir certaines TIAC et les maladies graves telles que la tuberculose et brucellose qui sont liées à la consommation du lait et à faire reculer la prévalence humaine de ces 2 maladies dans notre pays. L'efficacité de cette mesure simple pour éradiquer ces maladies a été démontrée par l'expérience passée en Europe et aux Etats Unis.

(iii) A l'endroit des collecteurs : Appeler à respecter l'hygiène durant la traite car le manque d'hygiène a une influence sur la qualité du lait et aussi d'éviter l'utilisation abusive des médicaments vétérinaires.

Bibliographie

Abdullatif F.M,Somda Mk,Fourreh AE,Okieh AA,Said CN,Mérito A and Yagi S.(2017) Evaluation of Microbiological quality of raw milk from farms and dairy producers in six districts of Djibouti.J.Food Microbiol.Saf. Hygiene -7p.

Acar J.F, Moulin G, Page S.W, Pastoret P.-P.(2012) Antimicrobial resistance in animal and public health: introduction and classification of antimicrobial agents, *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz*, **31**:15-21.

Adil M.S,Hind A.E,Intisar A.M.O.(2012) Detection of antibiotic residues in milk using Delvotest kit and Disc assay methods in Khartoum State, Sudan.UofK.J.Vet Med and animal Production Vol3 N°2,2012 (3-15) p14.

Afif A., Faid M., Chigr F., Najimi M. (2008) Survey of the microbiological quality of the raw cow milk in the Tadla area of Morocco. *International Journal of Dairy Technology* 61, No 4, pages 7.

AFSSA. (2006). Fiche de description de danger microbiologique transmissible par les aliments : Hygiène domestique,-5p

Ahn, J., Yang, L., Paster, B.J., Ganly, I., Morris, L., Pei, Z., and Hayes, R.B. (2011) Oral microbiome profiles: 16S rRNA pyrosequencing and microarray assay comparison. *PLoS One* 6(7): e22788. doi:10.1371/journal.pone.0022788

Alamedji R.B, Akakpo A.J, Teko-agbo A. (2008) Contrôle des résidus: exemple des antibiotiques dans les aliments au Sénégal. Manuscrit conférence OIE: Législation, enregistrement et contrôle des médicaments vétérinaires en Afrique. Dakar, Sénégal, 25-27 mars 2008.-11p.

Al Atrouni, A, Joly-Guillou, M.L., Hamze, M. and Kempf, M. (2016) Reservoirs of Non *baumannii* *Acinetobacter* species *Frontiers in microbiology* Mini review 1 février 2016 DOI 10.3389/fmicb.2016.00049.

Aning K.G,Donkor E.S,Omoro A,Nurah G.K,Osafu E.L.K,Staal S. (2007) Risk of exposure to marketed milk with antimicrobial drug residues in Ghana .*The Open Food Science Journal* 1,1-5.

Anses. (2013) Rapport de synthèse des études préliminaire et collaborative pour le Delvotest® T (DSM, Pays-Bas) dans le cadre de la marque NF Validation p77.

Anses (2014) Evaluation des risques d'émergence d'antibiorésistances liées aux modes d'utilisation des antibiotiques dans le domaine de la santé animale. , p.173.

Anses. (2013) Risques sanitaires liés à la pollution des milieux aériens et hydriques. Edition

Scientifique 1-47.

Aumaitre A. (1999) Quality and safety of animal products. *Livestock Product. Sci.*, 59, pages-113–124.

Bachtarzi, Nadia, Leila Amourache, and Gamra Dehkal. (2015) Qualité Du Lait Cru Destiné à La Fabrication d ' Un Fromage à pâte Molle Type Camembert Dans Une Laiterie de Constantine (Est Algérien). *International Journal of Innovation and Scientific Research* 17(1): 34–42.

Barathy, S., Lakshmanasami, G., Kannan, P., and Munnisamy, B. (2015) Prevalence of *Staphylococcus aureus* in raw milk: Can it be a potential public health threat. *Int. J. Adv. Research* - 7.p

Bar C., Moser A., Wechsler D. & Irmeler S. (2016) Insights into the microbial biodiversity of cheese. 25th International ICFMH Conference.

Bekhouche, F. (2006) Bactéries lactiques du lait cru de vache et microorganismes pectinolytiques des olives noires et vertes: Isolement et identification biochimique, évaluation et optimisation de la production de polygalacturonase. *Thèse de Doctorat unique, Université de Mentouri Constantine*, p.119p.

Bell C., Greenwood M., Hooker J., Kyriakides A., Rebecca M. (1997) Development and use of microbiological criteria for food. *Food Science and Technology Today*, 11, 137-176

Benhamed, N. (2014) Evaluation de la qualité microbiologique et sanitaire du lait cru dans la région d'Oran, Algérie. Etude du profil moléculaire virulent des staphylococcus aureus impliquées dans les mammites bovines. Thèse de doctorat en microbiologie Appliquée. Université d'Oran. Algérie 141p.

Berche P. Louis J. et Simonet M. (1991) Bactériologie: les bactéries des infections humaines, Paris Flammarion, Médecine-Sciences, 660p.

Bérodier A., Spinnler H.E. (2011) Microflore du lait et caractéristiques sensorielles des fromages. In : Réseau Fromages de Terroirs :Microflore du lait cru vers une meilleure connaissance des écosystèmes microbiens du lait et de leurs facteurs de variation. In: (Ed CL (ed) ouvrage collectif coordonné par Cécile Laithier (Ed).RMT Fromages de Terroirs. p 130p,29-30

Beuvier E, Berthaud K, Cegarra S, Dasen A, Pochet S, Buchin S et Duboz G. (1997) Ripening and Quality of Swiss-type Cheese Made from Raw , Pasteurized or Microfiltered Milk. *Int. Dairy Journal*

7:311–323.

Biagre S.T, Serge S, Mahamady T, Daniel I, Gertrude B T, Hadiza B I, S Caroline B, Alfred S T, Nicolas B. (2015) Détection biologique des résidus d'antibiotiques dans le lait et produits laitiers de vache consommés à , pp.8105–8112.

Bille PG, Haradoeb B, N Shigwedha. (2009) Evaluation of chemical and bacteriological quality of raw milk from Neudamm dairy farm in Namibia; *AJFAND ONLINE* 9 N°7-, 13 pages.

Boatto. G, Cerri. R, Pau. A. (1998) Monitoring of benzylpenicillin in ovine milk by HPLC. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 17: 733-738.

Bonfoh B, Dem S, Keita O, Delorenzi S, Traore H, Simbe CF, Alfaroukh IO, Farah Z, Nicolet J. (2003) Assessment of antibiotic residues by microbial inhibitor tests in fresh cow milk sold in Bamako (Mali). *Milchwissenschaft*, 58, (5–6): 304–307.

Bonfoh B, Fané A., Traoré N. A., Coulibaly Z., Simbé C. F., Alfaroukh O. I., Nicolet J., Farah Z., Zinsstag J. (2002) Qualité microbiologique du lait et des produits laitiers vendus en saison chaude dans le district de Bamako au Mali, *BIOTERRE, Rev. Inter. Sci. de la Vie et de la Terre*, N° spécial, -1-9p.

Bonfoh B., Fane A., Steinmann P., Hetzel M., Traore A.N., Traore M., Simbe C.F., Alfaroukh I.O., Nicolet J., Akakpo J.A., Farah Z., Zinsstag J. (2003)a. Qualité microbiologique du lait et des produits laitiers vendus au Mali et leurs implications en santé publique, -9 pages.

Boukary AR, Marichatou H, Vias G. (2007) Caractérisation des systèmes de production laitière et analyse des stratégies de valorisation du lait en milieu rural et périurbain au Niger: cas de la communauté urbaine de Niamey et de la commune rurale de Filingué. *Revue Elev. Méd. Vét. Pays Trop.* 60(1-4) :113-120.

Boukary A.R. (2013) Epidémiologie de la brucellose et de la tuberculose animales dans les milieux urbain, périurbain et rural au Niger *Epidemiology of animal brucellosis and tuberculosis in the urban, suburban and rural areas in Niger.*

Bradley A. (2002) Bovine mastitis: an evolving disease. *Vet. J.*, .164, 116–28.

Braem, G., De Vliegher, S., Verbist, B., Heyndrickx, M., Leroy, F., and De Vuyst L. (2012) Culture-independent exploration of the teat apex microbiota of dairy cows reveals wide bacterial species diversity. *Vet Microbiol* 157:383–390. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.12.031>.

Brisabois A, Lafarge V, Brouillaud A, De Buyser M L, Collette C, Garin Bastuji B et Thorel M F. (2000) Les germes pathogènes dans le lait et les produits laitiers : situation en France et en Europe. *Rev sci tech Off int Epiz* 16:452–461.

Brouillette, E., Grondin, G., Talbot, B.G., and Malouin, F. (2004) Inflammatory cell infiltration as an indicator of *Staphylococcus aureus* infection and therapeutic efficacy in experimental mouse mastitis. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 104(2005) 163-169.

Caridi A, Micari P, Caparra P, Cufari A, et Sarrull V. (2003) Ripening and seasonal changes in microbial groups and in physico-chemical properties of the ewes' cheese Pecorino del Poro. *International Dairy Journal* 13:191–200.

Cauchie E, Kergoulay G, Taminiau B, Delhalle L, Korsak N, Daube G. (2016) The use of 16S rRNA gene metagenetic monitoring of refrigerated food products for understanding the kinetics of microbial subpopulation at different storage temperatures: The example of white pudding. *International Journal of Food Microbiology*. Pages 9.

Casalta E, Montel M. (2008) Safety assessment of dairy microorganisms : The *Lactococcus* genus . *International Journal of Food Microbiology*.126:271–273. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2007.08.013

Ceugniez, A., Taminiau, B., Coucheney, F., Jacques, P., Delcenserie, V., Daube, G., and Drider D. (2016) Use of a metagenetic approach to monitor the bacterial microbiota of “Tomme d’Orchies” cheese during the ripening process. *International Journal of Food Microbiology*.21p.

Ceugniez, A., Drider, D., Jacques, P., Coucheney, F. (2015) Yeast diversity in a traditional French cheese “Tomme d’orchies” reveals infrequent and frequent species with associated benefits. *Food Microbiology* 52, 177-184.

Chaillou, S., Chaulot-Talmon, A., Caekebeke, H., Cardinal, M., Christieans, S., Denis, C., Helene Desmonts, M., Dousset, X., Feurer, C., Hamon, E., Joffraud, J.-J., La Carbona, S., Leroi, F., Leroy, S., Lorre, S., Mace, S., Pilet, M.-F., Prevost, H., Rivollier, M., Roux, D., Talon, R., Zagorec, M., and Champomier-Verges, M.-C. (2015) Origin and ecological selection of core and food-specific bacterial communities associated with meat and seafood spoilage. *International Society for Microbial Ecology J* 9, 1105-1118.

Châtaigner B, Stevens A (2003) Investigation sur la présence de résidus d'antibiotiques dans les viandes commercialisées à Dakar (Rapport projet PACEPA, Institut Pasteur de Dakar).-Dakar: Institut Pasteur.-66p

Chatellet M. (2007) Modalités d'utilisation des antibiotiques en élevage bovin : Enquête en Anjou. *Thèse Méd. Vét* : ALFORT, France. Page 224

Chen K., Pachter L. (2005) Bioinformatics for Whole-Genome Shotgun Sequencing of Microbial Communities , *PLOS Computational Biology*, vol. 1, p. 106-112.

Chiang T.M. and Rasberay V.W. (2008) Development of a dynamic system simulating pig gastric digestion. *Asian-Aust.J.Anim.Sci* vol.21,N°10:1522-1528.

Chye F., Abdullah A., and Ayob M. (2004) Bacteriological quality and safety of raw milk in Malaysia. *Food Microbiology*, 21,pp- 535–541.

Cock P.J.A., Fields C.J., Goto N., Heuer M.L., and Rice P.M. (2010) The sanger FASTQ file format for sequences with quality scores and the solexa/illumine FASTQ variants. *Nucleic Acid Research* 38(6): 1767-1771 DOI 10.1093/Nar/gkp1137.

Colinet, F.G. et al.(2013) Étude de la variabilité des aptitudes à la transformation laitière en Région wallonne basée sur l ' utilisation de la spectrométrie infrarouge. , pp.86–92

Commission Européenne(EC). (2004) Règlement N° 853 du 29 Novembre 2004 fixant des règles spécifiques d'hygiène applicables aux denrées alimentaires d'origine animale. *J.Off.Comm.Eur.*,2004.L226/22,61p

Commission Européenne(EC). (2005) Règlement N° 2073 du 15 Novembre 2005 concernant les critères microbiologiques applicables aux denrées alimentaires.*J.Off.Comm.Eur.*,2005.L338/1,26p

Commission Europeenne (EC). (2010) Commission regulation (EU) N°37/2010 of 22december 2009 on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of aniamal origin. page72

Commission Europeenne (EC) (2009) Community procedures N°470/2009 for the establishment of residue limits of pharmacologically active substances in foodstuffs of animal origin , p. 23

Chye F., Abdullah A., Ayob M. (2004) Bacteriological quality and safety of raw milk in Malaysia. *Food Microbiology*, 21,pp- 535–541.

Cissé S. A.(1997) Contribution à l'étude de la pasteurisation du lait: faisabilité technique et contrôle de la qualité dans la région de Kolda Thèse: Méd. Vét : Dakar ;.- 9

Coiffier O. (1997) Enterobactériaceae et Vibrionaceae. (133-166) in : Microbiologie alimentaire: Technique de laboratoire.-Paris : Lavoisier Tec & Doc; -1073 p.

Cowan D., Meyer Q., Stafford W., Muyanga S., Cameron R., Wittwer P. (2005) Metagenomic gene discovery : past, present and future, *Trends in Biotechnology (review)*, vol. 23, n° 6, p. 321-329.

David B. (2011) Le lait et les produits laitiers dans la nutrition humaine.Collection FAO :Alimentation et Nutrition N°28 pages 255

De Filippis, F., La Stora, A., Villani, F., Ercolini, D. (2013) Exploring the sources of bacterial spoilers in beefsteaks by culture-independent high-throughput sequencing. *PLoS ONE* 8(7): e70222. doi:10.1371/journal.pone.0070222.

Delcenserie, V.; Taminau, B., Delhalle, L., Nezer, C., Doyen, P., Crevecoeur, S., Roussey, D., Korsak, N., Daube, G. (2014) Microbiota characterization of a Belgian protected designation of origin cheese, Herve cheese, using metagenomic analysis. *Journal of Dairy Science* 97, 6046-6056.

Denayer S.,Delbrassine L.,Verhaeger B., et Botteldoorn N.(20016) Intoxications alimentaires en Belgique en 2016.Rapport annuel.AFSCA , pages37

Derzelle, S, Dilasser, F, Duquenne, M, and Deperrois, V. (2009) Differential temporal expression of the staphylococcal enterotoxins genes during cell growth. *Food Microbiol.* 2009 Dec;26(8):896-904. doi: 10.1016/j.fm.2009.06.007. Epub 2009 Jun 17

Desmaures BN, Gueguen M. (1997) Monitoring the microbiology of high quality milk by monthly sampling over 2 years. *Journal of Dairy research* 64 :271-280

Djibril, H A. (1996) Contribution à l'étude de La Qualité Du Lait Caillé Du Niger." Thèse :Med Vet ,Université cheick Anta Diop de Dakar.

Dieng M. (2001) Contributions à l'étude de la qualité microbiologique des laits caillés industriels commercialisés sur le marché dakarois Thèse: Méd : Vét : Dakar ; 10

Dortu C, Thonart P (2009) Les bactériocines des bactéries lactiques : caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires.*Biotechnol.Agron.Soc. Environ.* 13(1):143–154.

Dromigny E. (1997) Méthode de recherche, de dénombrement et d'identification de *Campylobacter*. (78 -103) in : Microbiologie alimentaire: Technique de laboratoire.- Lavoisier Tec & Doc.-1073p.

Duthoit F., Godon J. J., Montel M. C., (2003) Bacteria community dynamics during production of registered designation of origin salers cheese as evaluated by 16S rRNA gene single-strand conformation polymorphism analysis, *Appl. Environ. Microbiol.*, 69(7), 3840-3848.

Edder P. (2002) Analyse des résidus d'antibiotiques dans les denrées alimentaires d'origine animale.[Online]-Internet access http://www.geneve.ch/consommation/docs/medicamenteux_final.pdf (consulted le 02.11.2015).

Escobar-Zepeda, A., Godoy-Lozana, E. E., Raggi, L., Segovia, L., Merino, E., Gutiérrez- Rios, R. M., Juarez, K., Licea-Navarro, A.F., Pardo-lopez, L., and Sanchez-Flores, A. (2018) Analysis of sequencing strategies and tools for taxonomic annotation: Defining standards for progressive metagenomics. *Scientific reports* 8:12034 DOI: 10.1038/s41598-018-30515-5.

Ercolini D., Mauriello G., Blaiotta G., Moschetti G., Coppola S., (2004) PCR-DGGEfingerprints of microbial succession during a manufacture of traditional water buffalo mozzarellacheese. *J. Appl. Microbiol.*, 96, 263-270.

Ercolini D., Hill P. J., Dodd C. E. R., (2003) Bacterial community structure and location instilton cheese. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69(6),3540-3548.

Ericsson, V., Lindberg, A., Persson, W.K, Ekman, T., Artusson, K., Nilson-ost, M., and Bengtsson, B. (2009) Microbial aetiology of acute clinical mastitis and agent specific risk factors. *Vet Microbiol.* 2009 May 28 ;137(1-2) :90-7.

Esposito, A., and Kirschberg, M. (2014) How many 16S-based studies should be included in a metagenomic conference? It may be a matter of etymology. *FEMS Microbiology Letters* 351,145-146

FAO. (1992) Le lait et les produits laitiers dans la nutrition humaine.-Rome :FAO,pp-205-340.

-(Collection FAO, Alimentation et Nutrition ;28).

FAO. (2017) Revue des filières bétail/viande & lait et des politiques qui les influencent au niger.Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture et la Communauté Économique des États de l'Afrique de l'Ouest. pages 122.

FAO, (2015) Maximum residue limits (MRIs) and Risk management recommendation (RMRs) for residues of veterinary drugs in foods. page 41

Farhan M., Salik S.(2007) Evaluation of Bacteriological Contamination in Raw(Unprocessed) Milk Sold in Different Regions of Lahore (Pakistan), *Journal of agriculture & social sciences*, 3,pp- 104–106.

Farougou S, Kpodékon T.,M , Sessou P, Youssao I., Boko C, Yèhouenou B , Sohounhloué D. (2011) Qualité microbiologique du lait cru de vache élevée en milieu extensif au Bénin. Actes du 3^{ème} Colloque des Sciences, Cultures et Technologies de l'UAC-Bénin,-333-1-15pp.

Fleming A. (2014) Toxi infection alimentaires (TIAC) en Région Rhone-Alpes: Bilan et Analyse des causes. Gestion opérationnelle d'une suspicion de TIAC par une direction départementale de la cohésion sociale et de la protection des populations (DD(CS)PP): exemple dans le département de la Loire. Thèse N°106 Vetagro sup 1-310 pages.

Feurer C, Irlinger F, Spinnler HE, Glaser P, Vallaeyts T., (2004) Assessment of the rindmicrobial diversity in a farmhouse-produced vs a pasteurized industrially produced soft redsmear cheese using both cultivation and rDNA-based methods. *J. Appl. Microbiol.*, **97**, 546-556.

Fokou, G, B V Koné, and B Bonfoh. (2010) Mon Lait Est Pur et Ne Peut Me Rendre Malade': Motivations Des Acteurs Du Secteur Informel et Qualité Du Lait Local Au Mali. *Revue Africaine de Santé et de Productions Animales (RASPA)* 8: 75–86.

Forsbäck L, Lindmark-Mansson H, Svennersten Sjaunja K, Bach Larsen L, André A.(2011) Effect of Storage and Separation of Milk at Udder Quarter Level on Milk Composition, Proteolysis, and Coagulation Properties in Relation to Somatic Cell Count. *Journal of Dairy Science* 94(11): 5341–49. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22032356> (November 20, 2018).

Gagara, M., Philippe, S., Serge, A., Paulin, A., Issaka, Y., Souaïbou F., and Soumana. G.A. (2017) Analyses of constraints related to milk production in Liptako Gourma in Niger. *African Journal of Agricultural Research*. Vol. 12(23), pp. 1949-1958

Gaillard J.(1988) *Campylobacter* (151-158) in: *Bactériologie: les bactéries des infections humaines*. - Paris: Flammarion Médecine - Sciences, 660p

Ganda O.(2016) *Expérience des centres de collecte paysans multiservices au Niger*. Document de

synthèse issu des nombreuses études réalisées dans le cadre du projet Nariindu, par l'IRAA et ses partenaires Karkara VSF-B,AREN,RBM.pge 24.

Gelinas P. (2001) Répertoire des microorganismes pathogènes transmis par les aliments.- Paris: La fondation des Gouverneurs Edisem, 210 p

Ghafir, Y., and Daube, G. (2008) Comparison of swabbing and destructive methods for microbiological pig carcass sampling. *Letters in Applied Microbiology* 47, 322-326.

Ghozzi R., Morand P., Ferroni A., Beretti J.L., Bingen E., Segonds C., Husson M.O., Izard D., Berche P., Gaillard J.L., 1999. Capillary electrophoresis single-strand conformation polymorphism analysis for rapid identification of *Pseudomonas aeruginosa* and other Gramnegative nonfermenting bacilli recovered from patients with cystic fibrosis, *J. Clinical Microbiol.*,37, 3374 – 3379.

Giacometti F., A. Serraino, P. Bonilauri, F. Ostanello, P. Daminelli, G. Finazzi, M. N. Losio, G. Marchetti, G. Liuzzo, R. G. Zanoni, et R. Rosmini.(2012) Quantitative risk assessment of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 and *Campylobacter jejuni* related to consumption of raw milk in a province in northern Italy. *Journal of Food Protection*, Vol. 75, No. 11, 2012, Pages 2031–2038

Godon J.J., Zumstein E., Dabert P., Habouzit F., Moletta R., (1997) Molecular microbial diversity of an anaerobic digester as determined by small-subunit rDNA sequence analysis. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63(7), 2802-2813.

Haile, W., Zelalen, Y. and Yosef, T.G. (2012) Hygienic practices and microbiological quality of raw milk produced under different farm sizes in Hawassa, Southern Ethiopia. *Agricultural Research and reviews* Vol 1(4),pp.132-142,May2012

Hakyemez, I. N., Kucukbayrak, A., Tas, T., Yikilgan, A. B., Akkaya, A., Yasayacak, A., and Akdeniz, H. (2013) Nosocomial *Acinetobacter baumannii* infections and changing antibiotic resistance. *Pak.J.Med.Sci.* 29(5) :1245-1248.

Handelsman J. (2004) Metagenomics : application of genomics to uncultured microorganisms , *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, vol. 68, p. 669-685.

Hanzen Ch., L. Theron et A-S Rao (2013) Gestion de la reproduction dans les troupeaux bovins Laitiers RASPA Vol.11 N 91 0 S. <http://hdl.handle.net/2268/152344>

D.C., Hincheliff K.W.(2000) Disease caused by bacteria – *Mycobacterium*. In: Veterinary Medicine: A Text Book of Disease of Cattle, Sheep, Pig, Goat and Horses. 9th ed. Harcourt Publisher Ltd., London. 909–918.

Hogan J.S., Gonzales R.N., Oliviers S.P., Pankey J.W., Smith K. L. (1999) Laboratory hand book on bovine mastitis, 2nd édition, National mastitis council, Madison, USA,222p.

Hoogkamp-K, J.A. (2003) Nutrition and health infections caused by food. *Ned. Tijdschr. Geneesk.*, 147, pp-590–594.

Hutchison, M.L., Walters, L.D., Avery, S.M., Reid, C.A., Wilson, D., Howell, M., Johnston, A.M., and Buncic, S. (2005) A comparison of wet-dry swabbing and excision sampling methods for microbiological testing of bovine, porcine, and ovine carcasses at red meat slaughterhouses. *Journal of Food Protection* 68, 2155-2162

ICMSF.(1986) Microorganisms in Foods 2. Sampling for microbiological analysis: Principles and specific applications 2nd Ed. International Commission on Microbiological Specifications for Foods, - 278 p.

IDF. (1990) Hand book on milk collection in warm developing countries. IDF special issue N°9002 Brussels (Belgium), pp.1-148.

Institut National de la statistique-Niger (2016) Le Niger en Chiffres 2016. 1–84.

International Organization for Standardization (1999) Microbiology of food and animal feeding stuffs- Horizontal method for the enumeration of coagulase positive staphylococci (*Staphylococcus aureus* and others species)- Part 1: Technique using Baird parker agar medium. Geneva ISO 6888-1:1999 pages11.

International Organization for Standardization (2005) Microbiology of food and animal feeding stuffs Horizontal method for the detection and enumeration of presumptive *Escherichia coli* .Geneva ISO 7251:2005 pages 13.

Issa I. A. (2015) Bilan bactériologique des mammites dans les troupeaux Zébu Azawak à la station expérimentale sahélienne de Toukounous et épidémiologie moléculaire des staphylococcus aureus isolées entre 2009-2012. Thèse :Sc Vét : liège ;160p

Issa, G.A. (2012) Evaluation des pratiques d'utilisation des médicaments vétérinaires et détermination de la prévalence des résidus d'antibiotiques dans la viande et le lait dans le Gorgol en Mauritanie. Mémoire Master Méd. Vét, Sénégal. 31p

Jayarao, B.M. et L. Wang, (1999) A study of prevalence of gram-negative bacteria in bulk-tank milk. *J. Dairy Sci.*, 82, pp-2602–2604.

Kergourlay G , Taminiou B, Daube G, Vergès M.C. C. (2015) Metagenomic insights into the dynamics of microbial communities in food. *International Journal of Food Microbiology* 213 (2015) 31–39

Khamisse, E. (2012) Etude du microbiote susceptible de persister sur les surfaces d'un atelier de la filière viande bovine. Sociologie. AgroParisTech, 2012. Français. ffNNT : 2012AGPT0036ff. ffpastel-00770326f

Kim, I.S, Hur, Y.K., Kim, E.J., Ahn, Y.T., Kim, J.G., Choi, Y.J., and Huh, C.S. (2017) Comparative analysis of the microbial communities in raw milk produced in different regions of Korea. *Asian-Australas J Anim Sci* 30:1643-1650

Klaenhammer TR, Barrangou R, Buck BL, Azcarate-Peril MA et Altermann E (2005) Genomic features of lactic acid bacteria effecting bioprocessing and health. *FEMS Microbiology Reviews* 29:393–409. doi: 10.1016/j.femsre.2005.04.007

Kouamé-Sina, S.M., Bassa, A., Dadié, A., Makita, K., Grace, D., Djè, M. and Bonfoh, B. (2010) Analyse des risques microbiens du lait cru local à Abidjan (Côte d'Ivoire). *Revue Africaine de Santé et de Productions Animales* 8(S): 35-42.

Kouame Sina S.M, Bassa A, Dadie.A.(2010) Analyse des risques microbiens du lait cru local à Abidjan (Côte d'Ivoire): *Revue Africaine de Santé et de Productions Animales: RASPA*, 8:(1): 35-42.

Koivula, M., E. A. Mantysaari, A. Pitkala, et S. Pyorala. (2007) Distribution of bacteria and seasonal and regional effects in a new database for mastitis pathogens in Finland. *Acta Agric. Scand.* pp -89–96.

Korsak N, Taminiou,B.;Huppert,C.; Delhalle,L.;Nezer,C.;Delcenserie,V.;Daube,G.(2016) Assessment of bacterial superficial contamination in classical or ritually slaughtered cattle using metagenetics and microbiological analysis. *International Journal of Food Microbiology* p 8.

Labioui H., Elmoualdi L., Benzakour A., EL Yachioui M., Berny E. H., Ouhssine M. (2009) Etude physicochimique et microbiologique de laits crus. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, 148, 7-16pp.

Lafarge V. (2006) Identification des microorganismes du lait par des méthodes moléculaires et incidences des traitements thermiques et de la cinétique de croissance de *listeria monocytogenes*. Thèse Sc. Compiègne. Pages 283.

Lamprell H (2003) Production des entérotoxines dans les fromages en fonction de la diversité phénotypique et génétique des souches de *Staphylococcus aureus*. Thèse Docteur de l'Université de Bourgogne 1-223.

Larpent J.P.(1993) Aliments fermentés et ferments microbiens. *L'information du biotechnicien*, 1,(1)

Lebres E.H.A, A. Badis, F. Mouffok, D. Guetarni, R. OuzrouT.(2004) Contamination du lait cru de vache par *listeria monocytogenes* :Science et Technologie C N°22, pp 117-120.

Leyral G. et Vierling É. (2007) Microbiologie et toxicologie des aliments: hygiène et sécurité alimentaires. 4e édition Biosciences et techniques. 87p.

Li, N., Wang, Y., You, C., Ren, J., Chen, W., Zheng, H., and Liu, Z. (2018) Variation in Raw Milk Microbiota Throughout 12 Months and The Impact of Weather conditions. *Scientific Reports* 8:1-10. Doi:10.1038/s41598-018-20862-8.

Lopez J.C.J., Gachomo E.W., Sharma S., Kotchoni S.O. (2013) Genome sequencing and next-generation sequence data analysis : A comprehensive compilation of bio informatics tools and databases. *American Journal of Molecular biology*,3, 115-130.

Mahamadou M.G.(2016) Application de l'échographie à l'étude de la dynamique folliculaire lors de l'oestrus induit chez la vache Azawak au Niger. Thèse :Sc.Vét :Liège ;149p

Maillard.R. (2002) Antibiothérapie respiratoire. *La Dépêche Vétérinaire*. 80 : p 15-17

Makovec, J.A. and Ruegg, P.L.(2003) Antimicrobial resistance of bacteria isolated from dairy cow milk samples submitted for bacterial culture: 8 905 samples (1994–2001). *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, - 222, pp1582–9.

Marichatou.H, Kore.H,M Motcho.H.K et Vias.G.(2005) Synthèse bibliographique sur les filières laitières au Niger.- Niamey : Réseau de recherche et d'échanges sur les politiques laitières.-40p.

- Marietou, S., Vinsun, M., and Georges A.O. (2015) Composition Chimique et qualité bactériologique des laits crus et pasteurisés au Burkina Faso. *Afrique Science* 11(1) (2015) 142-154.
- McConnell, M.J., Luis, A., and Pacho, J. (2011) *Acinetobacter baumannii*: human infections, factors contributing to pathogenesis and animal models. *FEMS Microbiol Rev* 37 (2013) 130–155
- Minsitère de l’Elevage (MEL).(2013) Strategie de Developpement Durable de l’Elevage Cons Cab. 83 p.
- Mennane Z., Ouhssine M., Khedid K., El yachioui M. (2007) Hygienic quality of raw cow’s milk feeding from domestic waste in two regions in Morocco. *International Journal of Agriculture and Biology*, 9- 46–48.
- Mensah S.E.P., Koudandé O.D., Sanders P. (2014) Résidus d’antibiotiques et denrées d’origine animale en Afrique : risques de santé publique, Article Rev. sci. tech. Off. int. Epiz., n°10062014-00034-FR. 27p.
- Meroth C.B., Hammes W.P., Hertel C., (2003) Identification and population dynamics of yeasts in sourdough fermentation processes by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69(12), 7453-7461.
- Michel V, Hauwuy A, Chamba JF. (2001) La flore microbienne de laits crus de vache: diversité et influence des conditions de production. *Le Lait* 81:575–592. doi: 10.1051/lait:2001151
- Michel V., Hauwuy A., Montel MC., Coulon JB., Chamba JF. (2005) Symposium International “Territoires et Enjeux du développement régional”, Lyon, 9-11 Mars 2005
- Millogo V., G. A. Ouédraogo , S. Agenäs , K. Svennersten-Sjaunja.(2008) Survey on dairy cattle milk production and milk quality problems in peri-urban areas in Burkina Faso. *African Journal of Agricultural Research* Vol. 3 (3), pp. 215-224, March 2008
- Mohamed, A.F., Somda M.K., Fourreh A.E., Okieh A.A., Said C.N., Mérito A and Yagi S. (2017) Evaluation of Microbiological quality of raw milk from farms and dairy producers in six districts of Djibouti. *J.Food Microbiol.Saf. Hyg.* 2017.
- Monsallier, F., Verdier-Metz, I., Agabriel, C., Martin, B., and Montel, M.-C. (2012) Variability of microbial teat skin flora in relation to farming practices and individual dairy cow characteristics. *Dairy Sci. Technol.* 92, 265–278. doi:10.1007/s13594-012-0064-7.

Montesi A., Garcia-Albiach R., Pozuelo M.J., Pintado C., Goni I., Rotger R., (2005) Molecular and microbiological analysis of caecal microbiota in rats fed with diets supplemented either with prebiotics or probiotics. *Int. J. Food Microbiol.*, 98(3), 281-289.

Moullec M. 2002. Les sources de contamination microbiologique du lait de bovins de la production à la consommation dans les pays du Sud. Mémoire DESS. Université Montpellier 2

Nahaie MR, Goodfellow M, Minnikin DE, and Hajek V. (1984) Polar Lipid and Isoprenoid Quinone Composition in the Classification of *Staphylococcus*. *Journal of General Microbiology* 130 2427–2437.

Namegi RSP. (2006) Contribution à l'étude de la qualité microbiologique du lait dans la filière artisanale au Sénégal. Thèse de médecine vétérinaire de l'Université Cheick Anta Diop de Dakar (Sénégal). 164.

Nan, L., Yuezhu, W., Chunping, Y., Jing, R., Wanyi, C., Huanjan, Z., and Zhenmin, L. (2018) Variation in raw milk microbiota throughout 12 months and the impact of weather condition. *Nature/scientific reports*. pp 10.

Ndiaye A. (2001) Contribution à l'étude de l'assurance qualité dans l'industrie laitière: cas de NESTLE-SENEGAL.- Thèse: Méd. Vét : Dakar: 1994 ; 17

Neuman CG, Bwibo NO, Murphy SP, Sigman M, Whaley S, Allen LH, Guthrie D, Weiss RE et Demment M W. (2003) Animal source foods to improve micronutrient nutrition and human function in developing countries. *The Journal of nutrition* 133:3875S–4061S. doi: 0022-3166/03.

Njassap N., H. (2001) Contribution à l'étude de la qualité microbiologique du lait fermenté « Kossam » commercialisé dans les rues de Yaoundé (Cameroun) Thèse: Méd. Vét: Dakar; 11

Ngo, J., Taminiou, B., Fall, P.A., Daube, G., and Fontaine, J. (2018) Ear canal microbiota- a comparaison between healthy dogs and atopic dogs without clinical signs of otitis externa. *Vet Dermatol* 29:425-e140.

Niger. Institut National de la Statistique., (2014). Le Niger en chiffre 2014 ; -84p.

Niger. Ministère des Ressources Animales. (2007) Mise en place d'un projet de développement de la filière lait pour l'approvisionnement en lait cru des unités laitières de Niamey (MRA): rapport définitif. Organisation des Nations Unis pour le Développement Industriel ; -70p.

- Ogier J, Serror P. (2008) Safety assessment of dairy microorganisms : The Enterococcus genus .International Journal of Food Microbiology 126:291–301. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2007.08.017
- Ogier J.C., Lafarge V., Girard V., Rault A., Maladen V., Gruss A., Leveau J.Y., Delacroix-Buchet A., (2004) Molecular fingerprinting of dairy microbial ecosystems by use of temporal temperature and denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70(9), 5628-5643.
- OMS, FAO. (2007) Lait et produits laitiers, 1ère édition. Codex alimentarius, Rome,2007- 258 p.
- OMS. 2018. *Escherichia coli* (*E. coli*). Who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/E.coli. consulté le 07-02-2020.
- Organisation Mondiale de la Santé (OMS). (2007) Salubrité des aliments et maladies d'origine alimentaire. Aide-mémoire n°237-2007.
- Organisation Mondiale de la Santé (OMS). (2014) Antimicrobial Resistance : Global Report on Surveillance ;-257p.
- Ounine K., Rhoutaisse A., El haloui N.E. (2004) Caractérisation bactériologique du lait cru produit dans les étables de la région du Gharb. *Al Awamia*, 110,pp 187–204.
- Pardon B, Catry B, Dewulf J, Persoons D, Hosters M, De Bleecker K,Deprez P. (2012) Prospective study on quantitative antimicrobial and anti-inflammatory drug use in white veal calves. *J. antimicrob.Chemother.*67(4),1027-1038.DOI :10.1039/jac/dkr 570.
- Pawelczak K., Makowski M., Kempny M. (2002) Sulfamide antifolates inhibiting thymidylate synthase: synthesis, enzyme inhibition and cytotoxicity. *Acta Biochimica Polonica*. 49, p. 407-420.
- Phuektes, P., P. D. Mansell, et G. F. Browning.(2001) Multiplex polymerase chain reaction assay for simultaneous detection of *Staphylococcus aureus* and streptococcal causes of bovine mastitis. *J. Dairy Sci.* 84: pp-1140–1148.
- Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., Peplies, J., and Glöcker F.O. (2012) The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and webbased tools. *Nucleic Acids Res*; 41: D590–D596.
- Quigley, L., O’Sullivan,O., Stanton, C., Beresford,T.P., Ross,R.P.,Fitzgerald, G.F., and Cotter,P.D. (2013) The complex microbiota of raw milk. *FEMS Microbiol. Rev.* 37, 664–698

Raynaud S. et Heuchel V. (2005) Surveillance et maîtrise de la prévalence du portage des *Escherichia coli* producteurs de Shiga-toxines (STEC) dans les élevages bovins. Recherche des moyens de prévention de la contamination du lait cru à la production. Compte rendu du Ministère de l'Éducation nationale, de l'Enseignement Supérieur et de la recherche. pages 124

Reuben A.H. Treminio, M.L. Arias et C. Chaves (2003) Presence of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. in food from animal origin in Cost Rica. Arch. Latinoam Nutr., 53, pp- 389–392.

Reybroeck W. (2010) Screening for residues of antibiotics and chemotherapeutics in milk and honey. Doctorat thesis. Faculteit Diergeneeskunde Universiteit Gent. 295 p.

Rhissa, Z. (2010) Revue du secteur de l'élevage au Niger, Rapport provisoire (FAO/OMS) ,- 115p.

Rodriguez, C., Taminiou, B., Brevers, B., Avesani, V., Van broeck, J., Leroux, A., Gallot, M., Bruwier, A., Amory, H., Delmee, M., Daube, G. (2015) Faecal microbiota characterisation of horses using 16 rdna barcoded pyrosequencing, and carriage rate of *Clostridium difficile* at hospital admission. BMC Microbiology 15, -181.

Rodriguez-Valera F. (2004) Environmental genomics, the big picture? , *FEMS Microbiology Letters*, vol. 231, p. 153-158, 2004.

R. Development Core Team (2008) R : A language and environment for statistical computing. R. Foundation for Statistical computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL [http:// www.R-project.org](http://www.R-project.org)

SAS. (2001) Statistical System Institute, User's Guide: Statistics. SAS Institute, Inc., Cary, NC

Schloss, P.D., Gevers, D., Westcott, S.L., Ryabin, T., Hall, J.R., Hartman, M., Hollister, E.B., Lesniewski, R.A., Oakley, B.B., Parks, D.H., Robinson, C.J., Sahl, J.W., Stres, B., Thallinger, G.G., Van Horn, D.J., and Weber, C.F. (2011) Reducing the effects of PCR amplification and sequencing artifacts on 16S rRNA-based studies. *PloS one* 6, e27310.

Schwarz.S, Kehrenberg.C. (2001) Use of antimicrobial agents in veterinary medicine and food animal production. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 17 (6) : p431-437

Schwieger F., Tebbe C.C., 1998. A new approach to utilize PCR-single-strand conformation polymorphism for 16S rRNA gene based microbial community analysis, *Appl. Environ. Microbiol.*, 64(12), 4870-4876.

Seme k., Pitala W., et Osseyi G. E. (2015) Qualité Nutritionnelle et Hygiénique de laits crus de vaches allaitantes dans la région maritime au Sud-Togo. *European Scientific Journal* December 2015. édition vol 11, N°36 ISSN :1857-7881

Siegwald L. (2017) Solutions d'amélioration des études de métagenomique ciblée. *Bio-Informatique, Biologie Systémique [q-bio.QM]*. Université de Lille, 2017. Français. p283

Simonet M. (1988) *Yersinia*: les bactéries des infections humaines. Paris : Flammarion Médecine - Sciences, (127-147) in: *Bactériologie*: .pp127-147 - 660p.

Siousarran, V. (2003) Hygiène du lait cru en zone urbaine et péri-urbaine de Niamey, Niger. Rapport de Stage de DESS/Productions animales en régions chaudes. Université de Montpellier 2. pp66

Sissao M, Millogo V, Ouedraogo A. (2015) Composition chimique et qualité bactériologique des laits crus et pasteurisés au Burkina Faso. *Afrique Science*. 11:142–154.

Smithwell, N. and Kailasapathy, K. (1995) Psychrotrophic bacteria in pasteurized milk – problems with shelf life. *Australian Journal of Dairy Technology* 50, 28–31

Soumana B A. (2013) Étude de la distribution des médicaments vétérinaires et aspect réglementaire de la pharmacie vétérinaire au Niger. Thèse de doctorat en médecine vétérinaire à l'EISMV de Dakar (Sénégal). 135 pages

Stellato, G., De Filippis, F., La Stora, A., and Ercolini, D. (2015) Coexistence of lactic acid bacteria and potential spoilage microbiota in a dairy-processing environment. *Appl Environ Microbiol* 81: 7893–7904

Stoltz R. (2008) Les résidus d'antibiotiques dans les denrées d'origine animale : évaluation et maîtrise de ce danger. Thèse : Méd. Vét. : Lyon. 152 pages

Stratégie de Développement Rural (SDR). (2006) Comité Interministériel de pilotage de SDR : plan d'action de la SDR pour le secteur rural.

Stratev, D. and Odeyemi, O.A. (2016) Antimicrobial resistance of *Aeromonas hydrophila* isolated from different food sources: A minireview. *J. Infect. Public Health* 9, 535–544

Taibi, A., N. Dabour, M. Lamoureux, D. Roy, et G. Lapointe. (2011) Comparative transcriptome analysis of *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* strains under conditions simulating Cheddar cheese manufacture. *Int. J. Food Microbiol.* 146:pp-263–275.

Taybi N.O., Arfaoui A., Fadhi M. (2014) Evaluation de la qualité microbiologique du lait cru dans la région du Gharb, Maroc. *International Journal of Innovation and Scientific Research ISSN 2351-8014 Vol. 9 No. 2 Sep. 2014, pp. 487-493 © 2014 Innovative Space of Scientific Research Journals*<http://www.ijisr.issr-journals.org/>

Theunissen J., Britz T.J., Torriani S., Witthuhn R.C., (2005) Identification of probiotic microorganisms in south African products using PCR-based DGGE analysis. *Int. J. Food Microbiol.*, 98, 11-21.

Thieulin G. (1947) Conditions fondamentales de la qualité hygiénique du lait. *le lait*, INRA Editions, 27 pp 225-235.

Thoen C.O., Steele J.H., Gilsdorf M.J. (2006) *Mycobacterium bovis* Infection in Animals and Humans. 2nd ed. Blackwell Publishing Professional, Ames, Iowa, USA. 317 pp.

Thrusfield, M.V (1986) *Veterinary Epidemiology* (Londres, Butterworth Heinemann). pages 626.

TORMO H (2010) Diversité des flores microbiennes des laits crus de chèvres et facteurs de variabilité Thèse de doctorat de l'Université de Toulouse (France) p.258.

Trijbels-Smeulders, M.A., Kollee, L.A., Adriaanse, A.H., Kimpen, J.L., and Gerards, L.L. (2004) Neonatal group B streptococcal infection: incidence and strategies for prevention in Europe. *Ped Inf Dis J* 23:172-173. DOI 10.1097/01

Vacheyrou, M., Normand, A.C., Guyot, P., Cassagne, C., Piarroux, R., and Bouton, Y. (2011) Cultivable microbial communities in raw cow milk and potential transfers from stables of sixteen French farms. *Int. J. Food Microbiol.* 146, 253–262

Verdier-Metz, I., Michel, V., Delbes, C., and Montel, M.C. (2012) Cow teat skin, a potential source of diverse microbial populations for cheese production. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**, 326–333

Vias Franck S.G., Bonfoh B., Diarra A., Naferi A., Faye B. (2003) Les élevages laitiers bovins autour de la Communauté Urbaine de Niamey : Caractéristiques, production, commercialisation et qualité du lait, Etudes et recherches sahéliennes. N°8-9, 7p

Villar, A., Garcia, J.A., Iglesias, L., Garcia, M.L., and Otero A. (1996) Application of Principal Component Analysis to the Study of Microbial Populations in Refrigerated Raw Milk from Farms. *International Dairy Journal*, 6,pp 937-945.

Von Eiff. C., McNamara, P., Becker, K., Bates, D., Helei, X., Ziman, M., Bochner, B.R., Peters, G., and Proctor, R.A. (2006) Phenotype micro array profiling of *Staphylococcus aureus* menD and hemB mutants with the small-colony-variant phenotype. *J Bacteriol.*2006 Jan;188(2):687-693

Welearegay, Haile, Zelalem Yilma, and Yosef Tekle-Giorgis.(2012) Hygienic Practices and Microbiological Quality of Raw Milk Produced under Different Farm Size in Hawassa, Southern Ethiopia. *Agricultural Research and Reviews* 1(4): 132–42.

World Health Organisation (WHO). (2014) Antimicrobial Resistance: Global Report on Surveillance;- 257p.

Yamani M.I., Al kurdi I.M.A., Haddadin M.S.Y., Robinson R.K. (1999) A simple test for the detection of antibiotics and other chemical residues in ex-farm milk. *Food Control*, 10,- 35-39.

Youssao A.K.I., Dahouda M., Attakpa E.Y., Koutinhoun G.B., Ahounou G.S., Toleba S.S., Balogoun B.S. (2013) Diversité des systèmes d'élevages de bovins de race bovine Borgou dans la zone soudanaise du Bénin. *Int. J. Biol. Chem. Sci.*, 7(1), 125-146.

Zinsstag J (2003) Assessment of antibiotic residues by microbial inhibitor tests in fresh cow milk sold in Bamako (Mali). *Milchwissenschaft*,58,(5-6),304-3

Zhou G,Luo X,Tang Y,Zhang L,Yang Q,Qui Y,Fang C.(2008) *Kocuria flava* sp.nov. and *Kocuria turfanensis* sp.nov.,airborne actinobacteria isolated from Xingiang,China.*Int J Syst Evol Microbiol.*;58(Pt 6):1304-7.

Zhu X. Y., Zhong T., Pandya Y., R. D. Joerger R. D., (2002) 16S rRNA-based analysis of microbiota from the cecum of broiler chickens, *Appl. Environ. Microbiol.*, **68**(1),124-137.

Annexe

Survey on the presence of antibiotic residues in raw milk samples from six sites of the dairy pool of Niamey, Niger

Amadou Morou Madougou^{1,2}, Caroline Douny¹, Nassim Moula¹, Marie-Louise Scippo¹, Véronique Delcenserie¹, Georges Daube¹, Marichatou Hamani³ and Nicolas Korsak¹

1. Department of Food Science, Fundamental and Applied Research for Animal and Health, Faculty of Veterinary Medicine, University of Liège, Sart-Tilman, B43b Liège, B-4000 Belgium; 2. Laboratoire Central de l'Élevage (LABOCEL), Niamey, Niger; 3. Department of Animal Production Faculté d'Agronomie, Université Abdou Moumouni de Niamey, Niger.

Corresponding author: Amadou Morou Madougou, e-mail: amadoutin@yahoo.fr

Co-authors: CD: cdouny@uliege.be, NM: nassim.moula@uliege.be, MS: mlscippo@uliege.be,

VD: veronique.delcenserie@uliege.be, GD: georges.daube@uliege.be, MH: marichahamni@gmail.com,

NK: nkorsak@uliege.be

Received: 13-07-2019, Accepted: 01-11-2019, Published online: 14-12-2019

doi: [www.doi.org/10.14202/vetworld.2019.1970-1974](https://doi.org/10.14202/vetworld.2019.1970-1974) How to cite this article: Madougou AM, Douny C, Moula N, Scippo M, Delcenserie V, Daube G, Hamani M, Korsak N (2019) Survey on the presence of antibiotic residues in raw milk samples from six sites of the dairy pool of Niamey, Niger, *Veterinary World*, 12(12): 1970-1974.

Abstract

Background and Aim: Antibiotics are widely used in animal production for treating the diseases and for preventing or increasing animal growth. The presence of antibiotic residues in milk is a public health problem. The aim of this study was to assess the use of antibiotic residues in raw milk from the dairy pool of Niamey in three farms (Toukounous, Kirkissoye, and Niamey) and three collection centers (Hamdallaye, Kollo, and Say).

Materials and Methods: A direct interview (questionnaire) was used to collect data regarding the mode of use of antibiotics, the level of knowledge of farmers according to the withdrawal period, and a cross-sectional study was conducted on 192 samples of raw milk. The Delvotest[®] T was used to monitor antibiotic residues in milk. The data were analyzed using SAS and R software.

Results: The most commonly used antibiotics were those from the family of tetracycline (86.7%) and from the family of beta-lactams (13.3%). Regarding the statements of farmers, the reasons why the farmers use antibiotics were the following: About 47% in case of prevention and treatment, 29% for treatment, 12% for prevention, and 12% for increase dairy production. Moreover, the farmers lacked the necessary information about withdrawal period. Screening of antibiotic residues was performed using a standardized biological test kit, the Delvotest[®]. In total, from 192 samples of raw milk, 19 (9.9%) were positive including ten from collection centers and nine from farms. This could lead to a risk of exposure when a consumer drinks locally produced raw milk.

Conclusion: Raw milk supplied from the area of the study has a level of antibiotic residues, and the breeders have a low level of knowledge about the withdrawal period.

Keywords: antibiotic residues, cow, Delvotest, Niger, raw milk

Introduction

Milk occupies an increasingly important place in the daily diet of people in the world in general and sub-Saharan Africa in particular. Raw milk is an essential material of many dairy products (yogurt and Degué). In Niger, milk is a strategic component for nutritional and economic reasons [1]. The production results essentially from traditional breeding cows belonging to breeds such as Azawak, Goudali, Bororo, Djelli, and Kouri. In these farms, health treatment is performed empirically, involving indiscriminate use and uncontrolled veterinary medicines including antibiotics [2].

Residues in food from animal origin can constitute a risk for the consumer by initiating the following side effects: Allergic outcomes (penicillin and

streptomycin), poisoning (chloramphenicol), modification of the intestinal flora (tetracycline), and selection of antibiotic-resistant bacteria [2,3].

The uncontrolled use of antimicrobial drugs in general and antibiotics in particular in animal production can lead to the occurrence of residues in the dairy products processed from these animals, especially when the withdrawal period is not respected [2,4-6]. Besides, antibiotic residues in animal products will be the factor of environmental and water pollution. The administration of antibiotics imposes a withdrawal period, which is the time required for the animal body to remove completely chemical residue from treatment outcome. This period is specified on the instructions for the use of veterinary drugs, as long as, the product is authorized in the country. During this time, any use or consumption of meat, eggs, and milk is prohibited [7]. During the withdrawal period, animal slaughtering for human consumption is prohibited as well as delivering, for human consumption, products issued from these animals such as eggs and milk [7].

According to the harmful effects of veterinary drugs for humans, no residue monitoring program

Copyright: Madougou, et al, Open Access. This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

exists at present despite the fact that the demand for raw milk is constantly increasing in Niger. Veterinary drugs are also available, easily accessible to farmers, and their distribution is not controlled by the government authorities. Unfortunately, the data of antibiotics residue in milk are still nonexistent in Niger, and screening the residues in milk is urgently needed.

The aim of this study was to estimate the percentage of residual antimicrobial drugs in raw milk of the cow in different areas of Niger. Specifically, it was initially highlights the percentage of knowledge of the importance of use of antibiotics in the sites of Toukounous, Hamdallaye, Niamey, Kollo, Kirkissoye, and Say by survey then, to assess the prevalence of residual antimicrobial drugs in raw milk of the cow using a standardized biological test kit form, the Delvotest® T (DSM Food Specialities, Delft, Netherlands).

Materials and Methods

Ethical approval

Ethical approval is not needed for such type of study.

Informed consents

Informed consent was obtained from each participant.

Study area and period

The study was carried out in six sites, which are three farms (Toukous, Kirkissoye, and Niamey) and three collection centers (Hamdallaye, Kollo, and Say) from the dairy pool of Niamey (Niger) during the rainy season from July 2015 to September 2015. The survey questionnaires were administered to a total of 15 breeders: Twelve at collection centers (four collectors by center) and three in the farms (one in each farm). The choice of 15 breeders was based on the presence of the collector who was present during the period of survey and the manager of the farms. Milk collection is performed under the supervision of organizations of breeders around a collection center. Each organization is represented by a collector who collects milk with a motorcycle in 3-4 villages around a radius of 40 km to the center of Hamdallaye, 35 km for Kollo, and 15 for Say. The collector is the interface between the milk collection center and the breeders. The survey was performed at the rainy season during which few breeders continued to supply the collection centers because of the agricultural fieldwork.

The farm managers at the three farms were selected because they manage the organization, health, and sale of milk for the benefit of other farm members from Kirkissoye, Niamey, and Toukounous. The information has been collected on the types of antibiotics used, diseases encountered, general purpose of the antibiotics use, and the knowledge of the breeders about withdrawal period.

Sampling of raw milk

The study is a cross-sectional one and consisted of making samples from bulk tank milk in the three collection centers and three farms. Random cluster

sampling method was used to increase the representativeness of the study; we assumed a prior prevalence of 25% contamination of milk with antibiotics residues based on prior studies. This value was based on a similar study conducted in Ivory Coast where Kouamé [8] observed a prevalence of 24.7% of antibiotics residues in milk. The desired precision was fixed at 5% for a confidence interval of 95%.

The sample size based on prior studies [8] was calculated by the Thrusfield formula [9], which is:

$$N = p * (1-p) * Z^2 / i^2$$

Where: N is the sample size; Z is the Z value (e.g., 1.96 for 95% confidence level, confidence interval 5%); p is the percentage picking a choice, expressed as decimal; i is the confidence interval, expressed as decimal.

A total of 192 samples had been collected (the samples were distributed equitably among the six sites to avoid bias during statistical analyses 32 samples for each site) randomly in sterile containers and the milk samples were transferred to the laboratory at Central Laboratory of Livestock (LABOCEL).

Antimicrobial residues screening test

The cross-sectional study has involved screening of milk for antimicrobial residues using the standard microbiological methods called Delvotest® T (DSM Food Specialities, Delft, Netherlands) under the article number 5500786 and 8618000, respectively, kit 25 tests ZE/EF 25 and Delvotest apparatus 108-A marketed by N.V. International Medical Product S.A (Invoice of July 8, 2015). Ten mL of bulk milk were collected randomly in sterile containers on which the name of the site and number were listed. Delvotest® is based on the inhibition of microbial growth in the presence of antibiotic residues. Hundred mL of milk sample was transferred to the kit containing nutrient agar embedded with *Bacillus stearothermophilus* spores and bromocresol purple indicator using a micropipette and incubated at 64°C, and the results were recorded for 2-3 h. The residues of microbial growth were identified in the absence of antibiotics; the microorganism uses nutrients, ferments lactose, and produces lactic acid, which results in a change in the color of the bromocresol compound from purple to yellow. If the antibiotic residues exist, the microorganism cannot grow and the purple color of the medium remains unchanged.

Statistical analysis

The statistical analyses of the data were performed using the software SAS system 2001 (SAS Institute, Inc., Cary, NC) and the R software (version 3.2.5) (Ross Ihaker and Robert Gentleman, New Zealand) were used for statistical analysis. The significant level was considered at $p < 0.05$.

Results

The screening test results

A total of 192 milk samples were collected and tested for both the farms (96 samples) and collection

centers (96 samples). Overall, 9.9% (19/192) of milk samples tested were contaminated with antimicrobial drugs (Table-1). There were no significant differences between the farms and collection centers because of $p > 0.05$.

Survey about the use of antibiotics

Table-2 gives us information on the choice of antibiotics, the purpose of uses, use of milk, and knowledge of the breeders about withdrawal period.

The families of antibiotics used are mainly tetracyclines (oxytetracycline) (86.7%) followed by beta-lactam antibiotics (penicillin) (13.3%). They are used individually or in combination with vitamins. The diseases which need the use of antibiotics are infectious and non-infectious diseases (84.2%), metabolic diseases (5.2%), and others (10.5%).

According to the survey, the breeders did not respect the withdrawal period which indicates that the consumers of locally produced milk are exposed to the contamination of raw milk with unacceptable concentrations of antimicrobial residues. The highest risk of ingesting residues above the acceptable daily intake levels prescribed by the Codex Alimentarius Commission was deemed to be for beta-lactam or penicillin antibiotics due to their low acceptable daily intake and the high frequency of usage of these antibiotics locally especially in the treatment of infection and promote growth. The milk was used for family consumption and milk sales by 76.6% of breeders and 11.7% breeders used milk, respectively, for sales and processing according to the survey.

Discussion

For the first time in Niger that a qualitative test is used for a widespread assessment of drug residues present in raw milk collected from three farms and three collection centers in the dairy pool of Niamey. According to international standards, the presence of antibiotics in both milk and milk product is not acceptable because consumers may already have allergic reactions and some health problems [2]. Therefore, the presence of antibiotic residues in raw milk should be controlled because it can upset the process of dairy production and can permit the growth of some pathogens such as *Salmonella* and *Staphylococcus aureus* in milk [2].

The population interviewed during the study had no device to evaluate the quality of the produced milk. They performed only a traditional physical control of the milk (tasting, visual aspect, smell, color, and filtration). The surveyed breeders said that they do not have the resources necessary for quality control. However, the collection centers of Say, Kollo, and Hamdalaye had the device Delvotest[®] T available for the control of antimicrobial residues at reception.

This study has confirmed that tetracycline was the main group of antibiotics detected in milk samples. Thirteen of the interviewed persons were using antibiotics such as tetracycline and two used the

Table-1: Antimicrobial residue screening results.

Sites	Positive samples/total (%)	Positive/total by site (%)
Centers		
Say	4/32 (12.5)	10/96 (10.4%)
Kollo	1/32 (3.1)	
Hamdalaye	5/32 (15.6)	
Farms		
Kirkissoye	4/32 (12.5)	9/96 (9.4%)
Niamey	5/32 (15.6)	
Toukounous	0/32 (0)	
Total	19/192 (9.9)	

Table-2: Results of the survey as stated by breeders (n=15).

Parameters	Numbers of occurrences=n	%=n/N×100
Types of antibiotics used		
Oxytetracycline	13	86.7
Beta-lactam	2	13.3
Diseases encountered		
Infectious and non-infectious diseases	12	84.2
Metabolic diseases	1	5.2
Others without diagnosis	2	10.5
General purpose of use		
Preventive and curative	7	47
Curative	4	29
Preventive	2	12
Increase dairy production	2	12
Knowledge of the breeders about withdrawal period		
Same day of treatment	5	33.3
Three days after treatment	1	6.7
According to the notice of the drug	5	33.3
One week	2	13.3
No ideas about the withdrawal period	2	13.3
Milk use		
Family consumption and sales	11	76.6
Sales	2	11.7
Milk processing	2	11.7

beta-lactams for the treatment of diseases, and this statement is confirmed by other authors [10].

In Côte d'Ivoire, Kouamé [8] showed that tetracycline was generally used to treat sick cows. Furthermore, surveys by Alambédji *et al.* [2] revealed that one of the most used antibiotics in Senegal was also tetracycline, and the same was reported in Nigeria [11].

According to the answers of breeders, the antibiotics were used for preventive, curative, and to increase dairy production. In Belgium, Reybroeck [10] confirms the statements that the antibiotics are used for curative and preventive in a study on the search for antibiotic residues in milk.

Tetracycline imported from foreign countries seems to be the most used antibiotic family in the

West African sub-region. However, in Niger, imported veterinary drugs are dominated by antimicrobial compounds (86% of therapeutic classes) among which, 54% are trypanocides. The majority of veterinary products originate from Europe [12]. All surveyed breeders (100%) stated that they used antibiotics in their farms in case of infection [2,7].

According to the state of the breeders, the most antibiotics found on the market are penicillin-based drugs and oxytetracycline on the market [2,8]. Seven out of 15 breeders ignored the importance of the withdrawal period. The majority of interviewed persons did not respect the withdrawal period owing probably to their low education [7,13].

The produced milk was at the same time intended for family consumption, for business, and for processing into dairy products (like the processing of cheese called "Tchoukou"). These results are similar to those of Franck *et al.* [1] who showed that the proportion of milk sold was 68% against 32% intended for auto-consumption in Niger.

Among 192 raw milk samples collected for antimicrobial residue research using the Delvotest T, 19 were positive (9.9%) with no significant difference between farms and collection centers, which indicates that there is not enough control over the use of the antibiotics in Niger. The positive samples at collection centers and farms may be the results of the treatment of animals without respecting the withdrawal period. Another reason may be the addition of antibiotics as preservative by collectors when they have a long distance between the village and collection center [14,15]. The antimicrobial drugs are obtained without any control of authorities but in Belgium (Europe), for example, sales of veterinary products are done with an authorization to market granted by the European Commission, after opinion of the Committee for Medicinal Products for Veterinary Use established within the European Medicines Agency (centralized procedure) [16].

The obtained results of the number of positive milk samples in our study are lower than those observed in Côte d'Ivoire with 24.7% positive samples [8], in Ghana with 35.5% of positive sample [14], in Mali with 16% of positive samples [17], and Benin with 83% positive samples [7] but practically similar to those observed in Mauritania with 11% positive samples [18] using the Delvotest[®] T.

These results showed that milk contains residues of antibiotics in Niger as well as everywhere in West Africa. The presence of antibiotic residues could be a risk for the consumer so that there is an urgent need for a greater level of awareness among breeders regarding the withdrawal period following antimicrobial therapy. However, the breeding development faces several difficulties, including animal diseases that require the use of veterinary medicines, which can lead to the presence of residues in food of animal origin.

Delvotest[®] T is a very useful screening test, but it has the disadvantage of neither identifying the

molecule nor quantifying it and not confirms the level of antibiotics present in suspicious samples against the maximum residue limits fixed by the regulation [19].

On the other hand, increasing the level of health management of animals by local veterinary doctors and developing – in-house closed rearing systems can improve milk yield and meat production amounts then the control of veterinary drug administration rate. The public health entity for consumer protection which necessitates integration of local veterinary medical organization and human health authorities to support the cost of reducing contamination and discarding contaminated milk and meat by the veterinary medical drugs, as a recent recommendation of the WHO [20].

This study has exposed a potentially serious public health statement for consumers of raw milk in Niger and also repeated exposure over long periods to antimicrobial drug residues in milk can lead to drug resistance within population [14].

We, therefore, recommend further surveillance of milk for the detection of the presence of antibiotic residue and enforcement of the actual legislation on the use of antibiotics to ensure the safety of animal products in Niger.

Conclusion

In Niger, the breeding sector is a major source in terms of food security of the population and as well as a source of supply of animal protein. However, the breeding development faces several obstacles, including animal diseases that require the use of antimicrobial drugs, which can lead to the presence of residues in food of animal origin. The main factor considered to underlie the presence of antibiotic residues may be unrelated to the variation in the withdrawal period and the level of education. It is in this context that we have undertaken an investigation on the presence of residues in milk. The surveys make global identities of the antibiotics used by farmers and also to appreciate the different systems in connection with the use of antibiotics. Therefore, raw milk at the six sites in the dairy pool of Niamey contains antibiotic residues with a percentage of 9.9%. These results demonstrate the noncompliance of the withdrawal period, abusive use of antimicrobial drugs without any control of authorities, and the study has also revealed the fact that breeders use tetracyclines in 86.7% and 13.3% beta-lactams. There is no sufficient and necessary control over the farms and milk collection centers in determining the remaining antibiotics during the delivery of milk. The poor livestock management, low supervision over the livestock and husbandries, noncompliance with sanitary conditions including the obligatory vaccination can cause infections to the animals and the farmers have no choice other than using antimicrobial drugs for treatment.

On the other hands, Training of the farmers about the withdrawal period after treatment of diseased animals would be a very effective response in reducing antimicrobial residues in raw milk. Moreover, control

and detection of antibiotic residues in food and other products of animal origin can also be done to protect the health of consumers. It is recommended that the antimicrobial residue of any kind of antibiotics in Niger must be implemented with standards of the European Union in the absence of internal standards.

Research must be done to clearly define the risk factor of antimicrobial drug residues in raw milk in all the dairy pool of Niger and how it can introduce the respect of withdrawal period following drug administration.

Authors' Contribution

AMM: Prepared the questionnaire for data collection, sampling method, prepared the manuscript and made laboratory analysis. CD: Revised the manuscript. NM: Made and approved statistical analysis. MS: Revised the manuscript. VD: Prepared and revised the manuscript. GD: Revised the manuscript. MH: Revised the manuscript. NK: Prepared and revised the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgments

This work was carried out with the financial support (Grant no. WAAPP1C NIGER/IDA/NER 4877) of the West African Agriculture Productivity Program (PPAAO/WAAP) of Niger. The authors also thank the breeders for their collaboration and Nana Barira LAMINO for her participation in the laboratory analysis.

Competing Interests

The authors declare that they have no competing interests.

Publisher's Note

Veterinary World remains neutral with regard to jurisdictional claims in published institutional affiliation.

References

1. Franck, S.G.V., Boufob, B., Diarra, A., Nafiri, A. and Faye, B. (2003) Les Élevages Laitiers Bovins Autour de la Communauté Urbaine de Niamey: Caractéristiques, Production, Commercialisation et Qualité du Lait. Etudes et Recherches Sahéliennes, Niamey. p7.
2. Alamedji, R.B., Akakpo, A.J., Teko-Agbo, A., Chataigner, B., Stevens, A. and Garin, B. (2008) Contrôle des Résidus: Exemple des Antibiotiques Dans Les Aliments au Sénégal. Manuscrit Conférence OIE: Législation, Enregistrement et Contrôle des Médicaments Vétérinaires en Afrique, Dakar, Sénégal. p11.
3. Pawelczak, K., Makowski, M. and Kempny, M. (2002) Sulfamide antifolates inhibiting thymidylate synthase: Synthesis, enzyme inhibition and cytotoxicity. *Acta Biochim. Pol.*, 49(2): 407-420.
4. Bekhouche, F. (2006) Bactéries Lactiques du Lait Cru de Vache et Microorganismes Pectinolytiques des Olives Noires et Vertes: Isolement et Identification Biochimique, Evaluation et Optimisation de la Production de

- Polygalacturonase. Thèse de Doctorat Unique, Université de Mentouri Constantine. p119.
5. Colinet, F.G., Troch, T., Vanden, B.S., Soyeurt, H., Gengler, H., Abbas, O., Baeten, V., Dehareng, F., Sinnaeve, G., Dandenne, P. and Marianne, S. (2013) Etude de la Variabilité Des Aptitudes à la Transformation Laitière en Région Wallonne Basée Sur l'Utilisation de la Spectrométrie Infrarouge. Conference Paper. p86-92.
 6. ANSES. (2014) Evaluation des Risques D'émergence D'antibiorésistances Liées Aux Modes D'utilisation des Antibiotiques Dans le Domaine de la Santé Animale. ANSES, France. p173.
 7. Mensah, S.E.P., Aboh, A.B., Salifou, S., Mensah, G.A., Sanders, P., Abiola, F. and Koudandé, A.O.D. (2014) Risques dus aux résidus d'antibiotiques détectés dans le lait de vache produit dans le Centre Bénin. *J. Appl. Biosci. Elewa*, 80(1997-5902): 7102-7112. <http://dx.doi.org/10.4314/jab.v80i1.9>
 8. Kouamé, S.S.M. (2013) Contribution à la Gestion des Risques de Contamination Microbienne et Diversité Génotypique des Espèces du Genre Bifidobacterium Isolées de la Chaîne de Production du Lait Local à Abidjan (Côte d'Ivoire). Thèse Unique. Université Nangui Abrogoua, Abidjan. p234.
 9. Thrusfield, M.V. (1998) Veterinary Epidemiology. Butterworth Heinemann, Londres. p626.
 10. Reybroeck, W. (2010) Screening for Residues of Antibiotics and Chemotherapeutics in Milk and Honey. Doctorate Thesis. Faculteit Diergeneeskunde Universiteit Gent. p295.
 11. Ezenđuka, E.V., Oboegbulem, S.I., Nwanta, J.A. and Osumkwo, J.I. (2011) Prevalence of antimicrobial residues in raw table eggs from farms and retail outlets in Enugu State, Nigeria. *Trop. Anim. Health Prod.*, 43(3): 557-559.
 12. Soumana, B.A. (2013) Etude de la Distribution des Médicaments Vétérinaires et Aspect Réglementaire de la Pharmacie Vétérinaire au Niger. Thèse de Doctorat en Médecine Vétérinaire à l'EISMV de Dakar, Sénégal. p135.
 13. Biagre, S.T., Serge, S., Mahamady, T., Daniel, I., Gertrude, B.T., Hadiza, B.I.S., Caroline, B., Alfred, S.T. and Nicolas, B. (2015) Détection biologique des résidus d'antibiotiques dans le lait et produits laitiers de vache consommés. *J. Appl. Biosci.*, 87(1997-5902): 8105-8112.
 14. Aning, K.G., Donkor, E.S., Omoro, A., Nurah, G.K., Osafo, E.L.K. and Staal, S. (2007) Risk of exposure to marketed milk with antimicrobial drug residues in Ghana. *Open Food Sci. J.*, 1(1874-2564/07): 1-5.
 15. Adil, M.S., Hind, A.E. and Intisar, A.M.O. (2012) Detection of antibiotic residues in milk using Delvotest kit and Disc assay methods in Khartoum state, Sudan. *U. K. J. Wt. Med. Anim. Prod.*, 3(2): 14.
 16. BelVer-SAC. (2015) National Consumption Report of Belgian Veterinary Surveillance of Antibacterial Consumption. National Consumption Report. p40.
 17. Boufob, B., Dem, S., Keita, O., Delorenzi, S., Traore, H., Simbe, C.F., Alfaroukh, I.O., Farah, Z. and Nicolet, J. (2003) Assessment of antibiotic residues by microbial inhibitor tests in fresh cow milk sold in Bamako (Mali). *Milchwissenschaft*, 58(5-6): 304-307.
 18. Issa, G.A. (2012) Evaluation des Pratiques D'utilisation des Médicaments Vétérinaires et Détermination de la Prévalence des Résidus D'antibiotiques Dans la Viande et le Lait dans le Gorgol en Mauritanie. Master en Médecine Vétérinaire, Sénégal. p31.
 19. Edder, P. (2002) Analyse des Résidus D'antibiotiques Dans les Denrées Alimentaires D'origine Animale. Available from: http://www.geneve.ch/consommation/docs/medicamentueux_final.pdf. Last accessed on 02-11-2019.
 20. Organisation Mondiale de la Santé. (2014) Antimicrobial Resistance: Global Report on Surveillance. Organisation Mondiale de la Santé, Geneva. p257.

Presses de la Faculté de Médecine vétérinaire de l'Université de Liège

4000 Liège (Belgique)

D/2020/0480/9

ISBN 978-2-87543-156-1

